



Andreia Filipa Rondão Paulos

Licenciada em Ciências da Saúde

**Implementação e Validação do Método
Horizontal de Detecção de
Escherichia coli O157:H7 em carnes**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Professora Doutora Ana Lúcia Leitão,
Professora Auxiliar, FCT-UNL
Co-orientador: Engenheira Ana Machado, Diretora de
Laboratório, SGS

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes
Arguente: Prof. Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte
Vogal: Prof. Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Julho de 2014

**Implementação e validação do método horizontal de deteção de
Escherichia coli O157:H7**

Copyright © Andreia Filipa Rondão Paulos, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor

Agradecimentos

Agradeço a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta dissertação.

À professora Doutora Ana Lúcia Leitão pelos conhecimentos transmitidos e por toda a orientação.

À Engenheira Ana Machado e equipa pela disponibilidade de realização do estágio na empresa e por todos os conhecimentos transmitidos.

A toda a minha família e ao meu namorado, que sempre me apoiaram neste caminho árduo para um futuro próspero, por toda a compreensão, amor, carinho e paciência.

Aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado nesta demanda e que sempre demonstraram o seu apoio e amizade.

Às minhas colegas, Tatiana Frechaut, Liliana Matos e Ana Carvalho pelos momentos passados no laboratório e ajuda constante entre todas para a realização de todos os trabalhos.

Resumo

Escherichia coli O157:H7 é um agente patogénico emergente, associado com o decorrer de inúmeros surtos de origem alimentar um pouco por todo o mundo. Na origem desses surtos estão associados vários alimentos: leite, legumes crus tais como alfaces e espinafres, no entanto, a carne tem sido reportada como o principal veículo de transmissão desta estirpe. O contato pessoa-pessoa e a ingestão de água contaminada são também outras formas de contágio associadas ao dito microrganismo. A sintomatologia das infeções causadas por *E. coli* O157:H7 pode variar desde diarreias leves a severas e sanguinolentas, podendo em alguns casos mais graves evoluir para o Síndrome Urémico Hemolítico.

A carne é um meio ideal para o crescimento de microrganismos devido à sua composição. Aliado a este facto, a elevada manipulação com baixo padrão higiénico-sanitário pode ter um importante contributo na sua inocuidade facilitando o crescimento e desenvolvimento microbiano.

Desta forma, este trabalho teve como principal objetivo a implementação e validação do Método Horizontal de Detecção de *Escherichia coli* O157:H7, com algumas alterações, em 15 amostras de carne (ISO 16654-2001). No referido método foi utilizado o caldo de triptona de soja modificada com a adição de novobiocina (mTSB+N) como meio de enriquecimento. Posteriormente procedeu-se à inoculação nos meios seletivos CT-SMAC e chrom ID O157:H7 onde foi avaliada a presença de colónias características. Entre as 15 amostras, três foram identificadas com a presença de colónias típicas do microrganismo, pelo que se seguiram testes confirmativos, nomeadamente a produção de indol (positiva) e a aglutinação com anti-soro para *E. coli* O157:H7 (positivo). Paralelamente a este método foi realizado o método de PCR e VIDAS® UP *E. coli* O157 (including H7) (ECPT), atualmente em vigor no laboratório da SGS, de forma a averiguar a concordância de resultados entre as três metodologias.

Palavras-Chave: *Escherichia coli* Enterohemorrágica; *E. coli* O157:H7; Carne; Fatores de Virulência; Surtos; Síndrome Urémico Hemolítico.

Abstract

Escherichia coli O157:H7 is an emergent pathogen, related with food-borne infectious outbreaks all over the world. Several foods have been associated with those outbreaks, including milk, and raw vegetables as lettuce or spinach; however, the meat has been reported as the main vehicle of transmission of this strain. Person-to-person contact and contaminated water are also additional sources of infection associated to this microorganism. The symptoms of infections caused by *E. coli* O157:H7 can vary from light diarrhea to severe and bloody ones, evolving in some to Haemolytic Uraemic Syndrome.

Raw meat is an ideal substrate for the growth of microorganisms due to its composition. In addition, handling with low standard sanitary-health may have an important contribution to their safety by facilitating microbial growth and development.

Thus, the main objective of the present work was the implementation and validation of the horizontal detection method of *Escherichia coli* O157:H7 in 15 meat samples (ISO 16654-2001), with some modifications. The employed method used the Tryptone Soy Broth modified by the addition of novobiocin (mTSB+ N) as an enrichment medium. Subsequently samples were inoculated in selective media CT-SMAC and chrom ID O157:H7, which were evaluated for the presence of characteristic colonies on each medium. Among the 15 samples, three were identified by the presence of typical colonies of the microorganism. These identifications were further complemented by confirmatory tests, namely the production of indol (positive) and agglutination with antisera to *E. coli* O157:H7 (positive). Alongside to this method PCR and VIDAS® UP *E. coli* O157 (including H7) (ECPT), were also used. Those methods are currently employed in the SGS lab in order to determine the concordance between the three methods.

Keywords: Enterohemorrhagic *Escherichia coli*; *E. coli* O157:H7; meat; Virulence Factors; outbreaks; Hemolytic Uremic Syndrome.

Índice de Matérias

1 Introdução	1
1.1 A indústria da carne	1
1.2 Qualidade e Segurança Alimentar	3
1.3 Objetivos	6
2 Revisão Bibliográfica	7
2.1 <i>Escherichia coli</i> - Características Gerais	7
2.2 <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	8
2.3 <i>E. coli</i> O157: H7	9
2.4 Características de <i>E. coli</i> O157: H7	10
2.5 Fontes de Transmissão e principais reservatórios	10
2.6 Fatores que afetam o crescimento	11
2.7 Mecanismo de Toxicidade	12
2.8 Mecanismo de ação das toxinas Shiga	13
2.9 Fatores de Virulência	15
2.9.1 Toxinas: Shiga toxinas 1 e 2	15
2.9.2 Plasmídeo pO157	16
2.9.3 Hemosilina	17
2.9.4 Resistência ao ácido do estômago	17
2.9.5 Ilha de Patogenicidade LEE	18
2.10 Epidemiologia	19
2.10.1 Incidência nos Estados Unidos	20
2.10.2 Incidência no Canadá	22
2.10.3 Incidência na Europa	23
2.10.4 Incidência no Japão	25
2.10.5 Incidência em países da América do Sul	26
2.11 Diagnóstico e Tratamento das infecções causadas por <i>E. coli</i> O157:H7	27
2.12 Prevenção	28
2.13 Métodos de Detecção	29
2.13.1 Métodos Convencionais	30
2.13.2 Separação imunomagnética	31
2.13.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)	31
2.14 Ensaios Imunológicos: ELISA	32
3 A Empresa	33
4 Metodologia	36
4.1 Obtenção das amostras	36
4.2 Método Horizontal de Detecção de <i>E. coli</i> O157:H7	36
4.3 Método de PCR (método atualmente em uso pela empresa)	39
4.4 Método VIDAS® UP <i>E. coli</i> O157 (including H7) (ECPT) (atualmente em uso pela empresa)	40

5 Resultados e Discussão	41
5.1 Resultado PCR	41
5.2 Resultado VIDAS® UP <i>E. coli</i> O157 (including H7) (ECPT)	44
5.3 Resultado Método Horizontal.....	45
6 Conclusão	58
7 Referências Bibliográficas	60
8 Anexos.....	74

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Balanço de aprovisionamento de Carnes. Adaptado de INE (2012).....	2
Figura 1.2 - Estrutura do consumo Humano de carnes. Adaptado de INE (2012)	3
Figura 2.1 - Cronograma para notificação de casos de infeções causadas por <i>E. coli</i> O157. Adaptado a partir de <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> (http://www.cdc.gov/ecoli/reporting-timeline.html)9	
Figura 2.2 - Fontes de transmissão de <i>E. coli</i> O157:H7. Adaptado a partir de http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/FAO_E.Coli_FCC_2011.06.231.pdf	11
Figura 2.3 – Adesão de <i>E. coli</i> O157:H7 à mucosa intestinal. Adaptado de Rahal et al., 2012.	12
Figura 2.4 - Mecanismo de toxicidade da Toxina Shiga. Adaptado de Pacheco e Sperandio, 2012.	14
Figura 3.1 - Logotipo da Empresa.	33
Figura 4.1 - Método Horizontal de Detecção de <i>E. coli</i> O157:H7 com as alterações efetuadas.	38
Figura 4.2 - Aparelho de PCR, Bio-Rad DNA Engine®	39
Figura 4.3 - Barrete e cone mini-VIDAS.	40
Figura 4.4 – Aparelho mini-VIDAS.	40
Figura 5.1 - Colónias características nos meios seletivos. À esquerda, meio chromID O157 e à direita meio CT-SMAC.	45
Figura 5.2 – Colónias não características formadas nos meios seletivos. À esquerda meio chromID O157 e à direita meio CT-SMAC.....	47
Figura 5.3 – Formação de indol após a adição do reagente de Kovac's.	48
Figura 5.4 – Teste de aglutinação com anti-soro.	49
Figura 5.5 – Percentagem total das várias estirpes de <i>E. coli</i> detetadas. Adaptado a partir de Silveira et al. 2013.....	53
Figura 5.6 – Número de casos confirmados das várias estirpes de <i>E. coli</i> , durante o período compreendido entre 2002 e 2012. Adaptado de Silveira et al., 2013	54
Figura 5.7 – Número de amostras de alimentos no período de 2005-2006. Adaptado de EFSA 2007.....	57

Índice de tabelas

Tabela 1.1 - Tendências no consumo mundial de carne. Adaptado a partir de Ali e Pappa, 2011.	1
Tabela 2.1 - Casos de infeções STEC em seres humanos confirmados laboratorialmente na Europa em 2004. Adaptado a partir de WHO/FAO (2011)	23
Tabela 2.2 - Medidas preventivas de controlo de infeções por <i>E. coli</i> O157:H7.....	29
Tabela 5.1 – Resultados da Análise de PCR.....	41
Tabela 5.2 – Valores dos Controlos.....	42
Tabela 5.3 – Resultado VIDAS® UP <i>E. coli</i> O157.....	44
Tabela 5.4 – Valor de Referência do Teste VIDAS.....	45
Tabela 5.5 – Resultado do Método Horizontal de Detecção de <i>E. coli</i> O157:H7.	46
Tabela 5.6 – Resultados dos três métodos executados	50
Tabela 5.7 – Amostras positivas em 10 g no período de 2012-2013.	50
Tabela 5.8 – Amostras positivas em 25 g no período de 2012-2013.	51
Tabela 5.9 – Doenças de notificação obrigatória em Portugal. Adaptado da Portaria nº 1071/98 de 31 de Dezembro	52
Tabela 5.10 – Internamentos de episódios agudos e doenças infecciosas intestinais. Adaptado de Viegas et al. 2013	55

Lista de Abreviaturas

A/E - Lesão "*attaching and effacing*"

APEC - *E. coli* patogénica aviária

AR - Ácido-Resistente

ARM - Análise de Risco Microbiológico

BPW – Água peptonada tamponada

CT-SMAC – Cefixima-telurito Sorbitol MacConckey Agar

CDC - *Center for Diseases Control and Prevention*

Ces – Chaperoninas

CH - Colite Hemorrágica

CR- SMAC – Cefixima-ramnose Sorbitol MacConckey Agar

Ct – *Cycle threshold*

CT-M – Mistura de Cefixima- telurito

DI – Dose Infetante

dNTP – deoxinucleotidos

Eae - Gene codificador da intimina

EAEC - *E.coli* enteroagregativa

ECF – Fragmento conservado de *eae*

EHEC - *E.coli* enteohemorrágica

EIEC - *E. coli* enteroinvasiva

ELISA – *Enzyme Lynked Sorbent Assay*

EPEC - *E.coli* enteropatogénica

ETEC - *E.coli* enterotoxigénica

ETP- Sistema de secreção tipo II

EhxA - Gene codificador da enterohemolisina

Ehly - Enterohemolisina

EspA- Proteínas translocadora

EspB - Proteínas translocadora

EspD - Proteína translocadora

EspF – Proteína efetora

EspG- Proteína efetora

EspP - Serina protease

Esc – Gene codificador do sistema de secreção tipo III

Esp – Gene codificador das proteínas EspA, EspB, EspD

Gb3 - Globotriosil-ceramida

Gb4- Globotetraosil-ceramida

HACCP – Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo

Hly_a - Gene codificador da hemolisina
 IL-8 – Interleucina – 8
 IPAC – Instituto Português de Acreditação
 KatP- Catalase Peroxidase
 LEE - "*Locus of enterocyte effacement*"
 LPS – lipopolissacárido
 Map- proteína efetora
 mTSB+N – Caldo de triplicase de soja modificado suplementado com novobiocina
 NMEC - *E. coli* meningite neo natal
 PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
 PTT – Púrpura trombótica trombocitopénia
 RE - Reticulo Endoplasmático
 REDEC - *E. coli* enteropatogénica em coelhos
 RFV – *Relative Fluorescence Value*
 RpoS - Gene codificador do fenótipo de ácido tolerância em *E. coli*
 RTX - "*repeated in toxin*"
 SIM – Separação Imunomagnética
 SMAC – Sorbitol MacConkey Agar
 SNC – Sistema Nervoso Central
 SI – Sequências de Inserção
 SLT - Shiga like toxin
 STEC - *E. coli* Shiga toxina
 STCE – Metaloprotease de zinco
 STX - Toxina Shiga
 STX1 - Toxina Shiga1
 STX2 - Toxina Shiga2
 SUH – Síndrome Urémico Hemolítico
 TIR - *Translocated intimin receptor*
 Tox B- adesina
 TSA – Agar de Triptona de soja
 UPEC - *E. coli* uropatogénica
 V_t – Valor do teste
 VT_s - Verotoxinas
 VT1 - Verotoxina1
 VT2 - Verotoxina2
 VTEC - *E. coli* verotoxigénica

1 Introdução

1.1 A indústria da carne

A indústria da carne é uma oportunidade de negócio emergente, particularmente nos países em desenvolvimento, pois o consumo deste alimento pela população mundial é capaz de fornecer grande parte da energia necessária para a realização das demais funções biológicas.

Com o evoluir dos tempos o consumo de carne tem sofrido mudanças contínuas um pouco por todo o mundo, em parte devendo-se a problemas relacionados com a segurança e qualidade do produto em si ou simplesmente por alteração dos padrões alimentares. Segundo Speedy, embora haja um grande aumento na produção pecuária global, o padrão de consumo é muito desigual (Speedy, 2003).

Alterações na alimentação resultaram em consumos de carne geralmente mais elevados e um número crescente de pessoas por todo o mundo têm adotado dietas altamente energéticas ricas em proteína animal e gordura (Hupková e Turcekova, 2009).

Fatores como os rendimentos, urbanização, mudanças demográficas, a noção de como é efetuado o transporte dos alimentos, assim como a percepção dos consumidores em relação à qualidade e segurança têm vindo a modificar os padrões de consumo alimentar global. A constante mudança no consumo dos alimentos tem levado a um aumento do comércio e a mudanças na composição do comércio agrícola mundial. O padrão de consumo está a passar por mudanças significativas nos países em desenvolvimento, devido ao aumento dos rendimentos per capita, mudanças nos estilos de vida, preferências dos consumidores, preços e urbanização. (Ali e Pappa, 2011). Na tabela 1.1 encontram-se as tendências no consumo mundial de carne.

Tabela 1.1 - Tendências no consumo mundial de carne. Adaptado a partir de Ali e Pappa, 2011.

Regiões Geográficas	Consumo (em toneladas)			Porcentagem (%)		
	1980-82	1990-92	2005-07	1980-82	1990-92	2005-07
Carne de ruminantes						
África	4492	5395	7751	8,4	8,5	10,5
Américas	20636	22842	28250	38,4	36,1	38,2
Ásia	7740	12635	22757	14,4	20	30,8
Europa	19506	20981	13791	36,3	33,2	18,7
Oceânia	1384	1414	1368	2,6	2,2	1,9
Mundo	53758	63266	73918	100	100	100
Carne de não ruminantes						
África	1566	2691	5208	2	2,4	2,9
Américas	21291	28354	46415	27	25,2	25,9
Ásia	22291	43317	86520	28,3	38,5	48,3
Europa	33100	37220	39489	42	33,1	22
Oceânia	611	885	1556	0,8	0,8	0,9
Mundo	78858	112466	179188	100	100	100
Total de carne						
África	6058	8086	12959	4,6	4,6	5,1
Américas	41927	51196	74665	31,6	29,1	29,5
Ásia	30030	55951	109277	22,6	31,8	43,2
Europa	52605	58200	53280	39,7	33,1	21,1
Oceânia	1995	2298	2925	1,5	1,3	1,2
Mundo	132616	175732	253105	100	100	100

De acordo com a referida tabela pode verificar-se a progressiva mudança no consumo da carne ao longo dos anos. A Europa foi o maior consumidor de carne global entre 1980-1982 com uma quota de 40%, seguida das Américas (32%), enquanto em 2005-07 a Ásia se tornou o maior consumidor de carne com uma quota global de 43%. Essa mudança no consumo total de carne deve-se principalmente ao rápido aumento da população e do consumo de carne per capita ser menor do que a média mundial (Ali e Pappa, 2011).

Segundo o Decreto-Lei nº 147/2006, consideram-se as Carnes todas as partes comestíveis de animais das espécies bovinas, incluindo búfalos e bisontes, suína, ovina e caprina, bem como os solípedes domésticos, de aves de criação, de coelhos e lebres e de caça de criação e de caça selvagem, próprias para consumo humano, na aceção do Regulamento (CE) nº 853/2004, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril, que estabelece as regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal.

Em Portugal, a produção de carnes representa cerca de 25% da produção agrícola total.

Os últimos anos caracterizaram-se por uma instabilidade no mercado da carne, devido à subida significativa dos preços dos alimentos para animais, em consequência do aumento do custo das matérias-primas, como os cereais e a soja, associada posteriormente a uma crise económica e financeira a nível mundial, que afeta todos os sectores e, direta e indiretamente também o mercado da produção de carne (Observatório dos Mercados Agrícolas e das Importações Agro-Alimentares, 2010).

Portugal não produz carne suficiente para satisfazer as necessidades de consumo nacionais, que em 2012 totalizaram as 1 113 mil toneladas. Entre 2009 e 2012, a produção nacional de carne satisfaz, em média, 73% da carne consumida. Tendo em conta as diferentes espécies, a carne de animais de capoeira é a que apresenta o grau de auto-aprovisionamento mais elevado, em média, 90% entre 2009 e 2012. A produção de carne de bovino, pelo contrário, é a mais deficitária. Em média, e para o mesmo período, apenas cobriu 52% das necessidades de consumo (Figura 1.1) (INE, 2012).

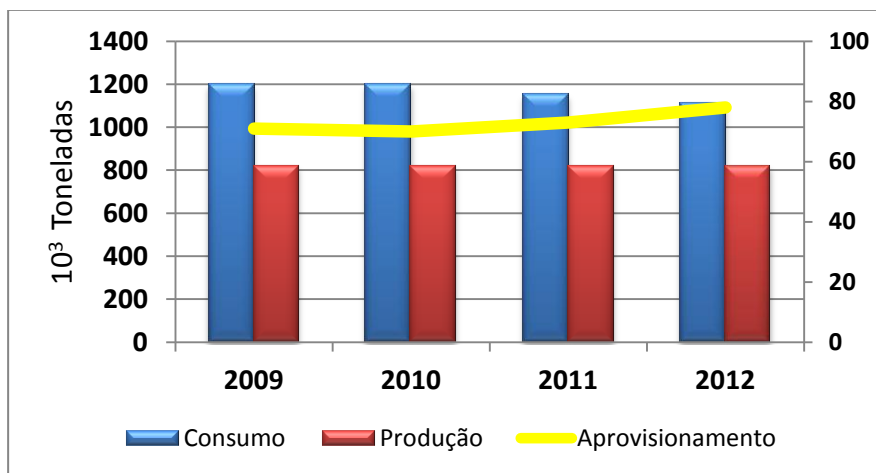


Figura 1.1 - Balanço de aprovisionamento de Carnes. Adaptado de INE (2012)

A análise ao consumo de carne entre 2009 e 2012 revela um decréscimo de 7%, para o que contribuíram as carnes de bovino (-15%), de suíno (-10%) e de ovino e caprino (-14%). O consumo de carne de animais de capoeira não foi exceção. Apesar do preço mais acessível, o consumo desta carne acompanhou a tendência de decréscimo verificada nas restantes espécies (-2%) (Figura 1.2) (INE, 2012).

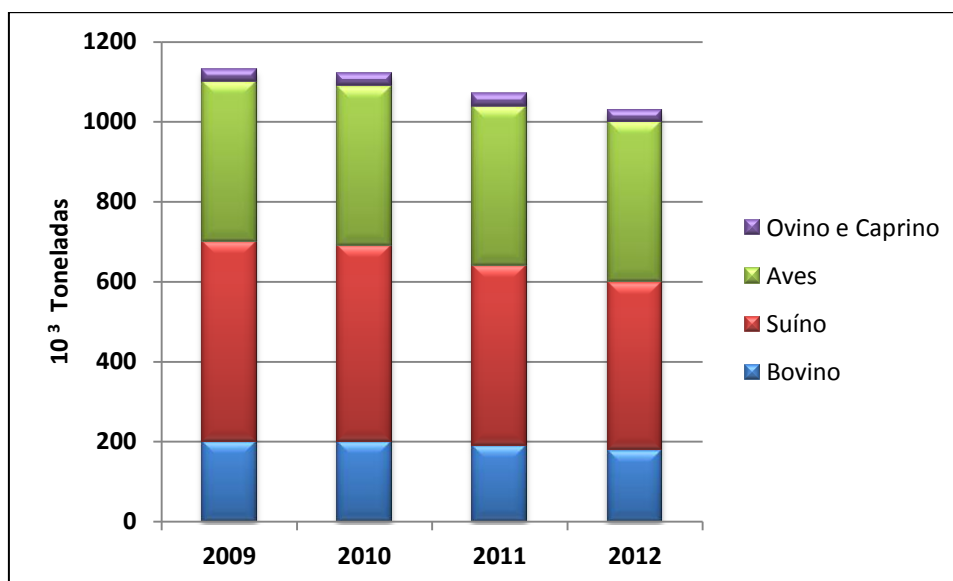


Figura 1.2 - Estrutura do consumo Humano de carnes. Adaptado de INE (2012)

1.2 Qualidade e Segurança Alimentar

Apesar da carne possuir alto valor nutricional pode, no entanto, sofrer determinadas alterações que podem comprometer a sua inocuidade facilitando o crescimento e desenvolvimento microbiano. Aliado a este facto, a alta manipulação com baixo padrão higiénico-sanitário pode levar à multiplicação de vários microrganismos.

A contaminação do músculo animal utilizado como alimento surge como consequência direta do abate e da preparação de carcaças de animais, onde uma ampla gama de microrganismos provenientes de fontes diferentes é transferida para a superfície da carne que é rica em nutrientes (Raftari et al., 2009).

Entre as zoonoses de crescente interesse, tanto para a saúde humana, como para a sanidade animal, estão as contaminações por *E. coli* O157:H7 que são responsáveis por uma significativa incidência de processos patológicos em seres humanos. Esta bactéria, produtora de toxinas pode provocar diarreia aquosa que posteriormente se pode tornar diarreia sanguinolenta, sendo esta patologia designada de colite hemorrágica. Este microrganismo pode igualmente

causar o síndrome urémico hemolítico (SUH), doença caracterizada por anemia hemolítica, trombocitopénia e insuficiência renal, ocasionando um sério risco de vida (Lowe et al., 2009).

A transmissão de *E. coli* O157:H7 pode ocorrer através de alimentos contaminados, como carne moída, leite cru, através de água contaminada, e por contacto pessoa-a-pessoa (Hermos et al., 2011). No entanto, segundo Kim e colaboradores esta estirpe foi igualmente isolada em animais domésticos e animais selvagens. O gado bovino é considerado o principal reservatório desta bactéria (Kim et al., 2005).

Deste modo, face aos variados efeitos produzidos por este microrganismo, é fundamental que sistemas de controlo de perigos e de gestão da sua segurança sejam estabelecidos com base em princípios claros e aceitáveis por todas as entidades responsáveis, devendo portanto, fazer-se uma avaliação de risco microbiológico (Sant'ana e Franco, 2009).

A análise de risco microbiológico (ARM) é uma ferramenta valiosa para as organizações encarregues pela compreensão, redução e prevenção dos riscos desencadeados por microrganismos patogénicos. A crescente globalização tem agravado esses riscos, com a ampliação e muitas vezes a rápida distribuição de doenças. Métodos de avaliação de riscos claros e credíveis tornam cada vez mais necessário que as entidades competentes atuem para resolver ambos os riscos atuais e futuros associados à contaminação do ar, água, solo e alimentos por bactérias, fungos, protozoários, vírus e as suas toxinas (Microbial Risk Assessment, 2012).

A análise de risco é composta por três elementos: avaliação de risco, gestão do risco e comunicação do risco. A avaliação de risco é a parte científica do processo em que os perigos são identificados e os riscos apresentados pelo respetivo perigo são calculados. Posteriormente à identificação do perigo procede-se à avaliação da exposição que é uma estimativa quantitativa da presença de um contaminante numa porção do alimento no momento do consumo, de forma a perceber qual o efeito desse contaminante no ser Humano – caracterização do perigo – e qual o risco geral para uma determinada população – caracterização dos riscos. Os princípios da avaliação de risco, incluindo as quatro etapas envolvidas (identificação do perigo, avaliação da exposição, caracterização do perigo e caracterização dos riscos) são descritos pelo *Codex Alimentarius Commission* (Duffy et al., 2006). Com todos estes conhecimentos é possível estabelecer o grau de risco de um determinado alimento em causar uma determinada doença. Assim, para que se possa caracterizar o real perigo existente nas carnes é importante a realização de metodologias que permitam a rápida e eficaz deteção de *E. coli* O157:H7 e também de outros microrganismos garantindo um rigoroso controlo e assegurando a qualidade e a segurança alimentar do produto a ser consumido.

Deste modo, é um direito das pessoas terem a expectativa de que os alimentos que ingerem são seguros e adequados para consumo. As doenças e os danos provocados por alimentos podem mostrar-se desagradáveis, e na pior das hipóteses fatais, sendo que, podem

ocorrer outras consequências, tais como os surtos que podem prejudicar o comércio e o turismo, gerando perdas económicas, desemprego e conflitos. Alimentos deteriorados causam desperdício e aumento de custos, afetando de forma adversa o comércio e a confiança do consumidor. Outro facto que se tem verificado diz respeito ao aumento do comércio internacional de alimentos e às viagens internacionais, que como resultado acarretam, não só importantes benefícios socioeconómicos, mas também a disseminação de doenças por todo o mundo (Codex Alimentarius, 2003).

As mudanças das características demográficas de certas regiões, hábitos culturais, deficiente vigilância da produção alimentos e tendências globais de mercado, são alguns dos fatores que estão fortemente ligados ao desenvolvimento de doenças de origem alimentar. Além disso, englobam-se também as condições higiénico-sanitárias dos locais de comercialização, manipulação, transporte e armazenamento de alimentos, assim como os mecanismos de virulência e de adaptação de determinados microrganismos (Mittelstaedt e Carvalho, 2006).

Ao longo dos tempos tem vindo a verificar-se uma constante modificação dos hábitos alimentares, o que por si só leva a que sejam desenvolvidas novas técnicas de produção, preparação, análise e distribuição de alimentos. Assim, é cada vez mais imprescindível um controlo eficaz para se evitar consequências prejudiciais decorrentes de doenças e danos provocados pelos alimentos à saúde humana e à economia. Deste modo, tendo em conta a qualidade do alimento (que pode ser definida como o grau de excelência de um alimento, atendendo às características que o tornam um alimento aceitável), segurança alimentar significa garantir ao consumidor a aquisição de alimentos com atributos nutricionais e sanitários adequados às suas necessidades. Nessa direção, o termo de segurança alimentar implica alimentos de boa qualidade, livres de contaminação de natureza química, biológica ou física, ou de qualquer outra substância que possa acarretar problemas à saúde do consumidor (Ortega e Borges, 2012).

1.3 Objetivos

Nos últimos anos *E. coli* O157:H7 tem ganho maior visibilidade na medida em que tem sido associada a grandes surtos derivados de contaminações alimentares. Apesar de ser menos incidente que as demais estirpes, a severidade com que desencadeia patologias reflete um sério risco para a saúde. Assim, torna-se essencial a sua detecção, de forma a proteger e a salvaguardar a saúde dos consumidores.

O presente trabalho tem como objetivo a implementação e validação do Método Horizontal para Detecção de *E. coli* O157:H7, segundo a ISO 16654-2001, com ligeiras adaptações. Pretende-se, assim:

- Isolar *E. coli* O157:H7 através da alteração do referido método;
- Investigar em matrizes alimentares, nomeadamente carnes picadas, possíveis contaminações por *E. coli* O157 H7;
- Analisar os resultados obtidos na pesquisa de *E. coli* O157:H7 desde 2012 à data;
- Comparar os resultados obtidos pelo método a implementar com os resultados dos métodos atualmente em uso na empresa.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 *Escherichia coli* - Características Gerais

Escherichia coli é a espécie predominante entre os diversos microrganismos anaeróbios facultativos que fazem parte da microbiota entérica de Humanos e animais de sangue quente. O significado da sua presença nos alimentos indica contaminação microbiana de origem fecal e, portanto condições higiênicas insatisfatórias (Franco et al., 2008).

Escherichia coli, bactéria pertencente à família *Enterobacteriaceae*, é uma bactéria Gram negativa, anaeróbia facultativa e oxidase negativa, faz parte do grupo dos coliformes termotolerantes que são capazes de fermentar a lactose a 44,5-45,5°C em 24 horas com produção de gás (Oliveira, 2012). Segundo Bastos, esta bactéria fermenta ainda a glicose através de fermentação ácido-mista, produzindo ácido láctico, acético e fórmico. A grande maioria das estirpes possui capacidade para produzir gás a partir da hidrólise do ácido fórmico, sendo capaz de utilizar várias fontes de carbono, como o acetato, glicose e lactose, mas não o citrato. Produz indol, no entanto não hidrolisa a ureia nem produz sulfeto de hidrogénio (Bastos, 2009).

A enzima β -glucuronidase é produzida por 96% das estirpes de *E. coli*, enquanto, segundo Karmali (1989), citado por Bastos, a fermentação de sorbitol é realizada em 24 horas por 95% das estirpes de *E. coli* (Bastos, 2009).

Escherichia coli pode ser classificada serologicamente em serogrupos e serotipos com base na sua composição antigénica: antígenos O ou somáticos para os serogrupos, e antígenos flagelares ou H para os serotipos. Pode, ainda, expressar antígenos K ou capsulares, importantes na patogénese. Este esquema, O: H: K estabelecido por Kauffmann em 1947 possibilitou um grande avanço na identificação de *E. coli* (Bertão e Saridakis, 2007). Posto isto, pode-se realçar a existência de diferentes estirpes desta bactéria, sendo algumas delas patogénicas tanto para o Homem como para animais.

De acordo com a determinação dos mecanismos de virulência, as estirpes patogénicas podem ser causadoras de diarreias, podendo estas em alguns casos ser sanguinolentas. Existem vários tipos de estirpes patogénicas de *E. coli*, incluindo-se portanto EPEC (*E. coli* enteropatogénica), ETEC (*E. coli* enterotoxigénica), EIEC (*E. coli* enteroinvasiva), EHEC (*E. coli* enterohemorrágica), EAEC (*E. coli* enteroagregativa), UPEC (*E. coli* uropatogénica), NMEC (*E. coli* meningite neo natal), REDEC (*E. coli* enteropatogénica em coelhos) e APEC (*E. coli* patogénica aviária) (Corrêa, 2012; Mittelstaedt e Carvalho, 2006).

Dentro deste vasto grupo de estirpes dar-se-á destaque à EHEC.

2.2 *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)

Entre as estirpes anteriormente mencionadas, destacam-se as EHEC, que produzem fatores citotóxicos descritos como verotoxinas (VTs) ou toxinas Shiga-Like (SLT) (Garcia et al., 2008).

E. coli enterohemorrágica é também designada de *E. coli* verotoxinogénica (VTEC) ou de *E. coli* shiga toxigénica (STEC) por ter a capacidade de produzir toxinas que são citotóxicas para as células Vero (células epiteliais de rim extraídas a partir do macaco verde Africano) e por ser semelhante à toxina produzida pela *Shigella dysenteriae* (Smith e Scotland, 1988). Existem dois sistemas de nomenclatura para as toxinas produzidas por EHEC: no Reino Unido são designadas por verotoxinas ou verocitotoxinas (VT1 e VT2), enquanto nos Estados Unidos tomam a designação de Shiga toxinas (STX1 e STX2). Consoante a nomenclatura utilizada, as estirpes que as produzem são denominadas VTEC (*E. coli* verotoxigénica) ou STEC (*E. coli* Shiga toxigénica) (Bastos, 2009).

A EHEC encontra-se relacionada com uma série de doenças, que vão desde diarreias leves à colite hemorrágica (CH) e ao síndrome urémico hemolítico (SUH), sendo que neste caso um eventual agravamento pode levar à insuficiência renal, e à púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), em seres humanos (Bertão e Saridakis, 2007). Ambas as doenças, SUH e PTT, apresentam manifestações clínicas semelhantes, o que por vez torna difícil a sua distinção e um correto diagnóstico. Caracterizam-se sobretudo pela presença de anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia e fenómenos de trombose. No SUH os microtrombos confinam-se primariamente ao rim, originando um quadro de insuficiência renal aguda, e atingem predominantemente a vasculatura glomerular e pré-glomerular, com evidente incidência na criança. A PTT, por seu lado, apresenta um envolvimento sistémico, sobretudo do sistema nervoso central (SNC), com formação intermitente de microtrombos e, consequentemente, associada a sinais neurológicos flutuantes. Este quadro predomina na idade adulta (Pessegueiro e Pires, 2005).

O período de incubação, desde o momento da ingestão, para os primeiros sintomas varia de um a oito dias. Normalmente, a doença começa com dores abdominais e diarreia sem sangue que pode, mas não necessariamente, evoluir para diarreia sanguinolenta dentro de dois a três dias (FAO, 2002). Esta condição normalmente afeta crianças com idades inferiores a 5 anos, sendo a causa mais comum de insuficiência renal aguda em crianças (Marejková et al., 2013).

Pertencente ao grupo de EHEC, encontram-se as estirpes de *E. coli* O157:H7, produtoras de toxinas shiga, que se fixam e provocam lesões nas células epiteliais humanas (Oliveira, 2012). Na figura 2.1 pode verificar-se de um modo geral o processo evolutivo, desde a ingestão até à manifestação de sintomas.

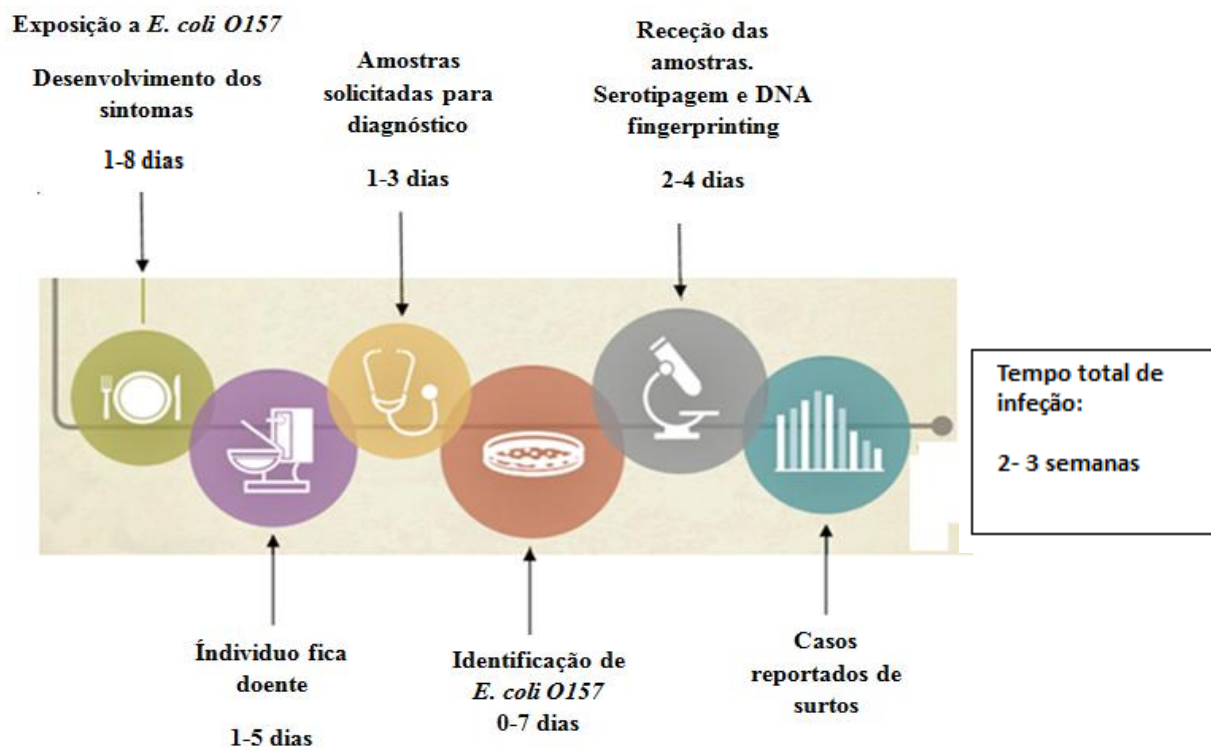


Figura 2.1 - Cronograma para notificação de casos de infecções causadas por *E. coli* O157. Adaptado a partir de *Centers for Disease Control and Prevention* (<http://www.cdc.gov/ecoli/reporting-timeline.html>)

2.3 *E. coli* O157: H7

Escherichia coli O157:H7 é um agente patogénico bacteriano produtor de toxinas presente em alimentos e na água e que tem sido fortemente associado a grandes surtos de doenças gastrointestinais (Manning et al., 2008). Os primeiros surtos causados por *E. coli* O157:H7 ocorreram nos Estados de Oregon e Michigan, EUA, em 1982, quando foi isolado a partir de indivíduos que desenvolveram diarreia sanguinolenta e cólicas abdominais severas depois da ingestão de hambúrgueres contaminados e mal cozinhados (Pennington, 2010; Rangel et al., 2005; Bertão e Saridakis, 2007). Desde então esta bactéria tem sido isolada em numerosos surtos envolvendo colite hemorrágica e síndrome urémico hemolítico (Garcia et al., 2008). Tem sido isolada a partir das fezes ou do trato gastrointestinal do gado bovino, ovelhas, cavalos, porcos, perus, cães, e uma variedade de espécies animais selvagens (FAO, 2002).

2.4 Características de *E. coli* O157:H7

A temperatura ótima de crescimento de *E. coli* O157:H7 é 37°C, apresentando um crescimento praticamente nulo a temperaturas acima de 44°C - 45°C e a temperaturas inferiores a 8°C - 10°C. Esta estirpe sobrevive ao congelamento, havendo apenas uma diminuição na concentração (Bastos, 2009; Buchanan e Doyle, 1997).

Além da temperatura referida anteriormente, as principais características que distinguem *E. coli* O157:H7 das demais estirpes, são o facto de não fermentarem ou apenas fermentarem muito lentamente o sorbitol e não produzirem a enzima β -glucuronidase, além de tolerar menores concentrações de sais biliares (WHO/FAO 2011; Silveira, 2010).

Nas interações entre compostos químicos e os sistemas biológicos existe sempre uma relação entre a quantidade de substância administrada - Dose - e a reação tóxica desenvolvida – Resposta. De acordo com este princípio e tendo em conta os vários registos de surtos um pouco por todo o mundo, constata-se que ainda não está bem definida qual a dose infetante desta estirpe. No entanto, segundo vários estudos de análise de alimentos responsáveis por surtos, a capacidade da transmissão através do consumo de água ou alimentos contaminados, ou através do contacto com animais ou pessoas infetadas, aliada à capacidade do agente patogénico tolerar as condições ácidas permitindo a sua sobrevivência no ambiente ácido do estômago, referenciaram que uma dose infetante de *E. coli* O157:H7 deve ser inferior a algumas centenas de células, até mesmo uma ingestão inferior a 10 células (WHO/FAO, 2011). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), outros estudos realizados demonstraram que a dose infetante necessária para causar infeções seria menor do que 2 células por cada 25 miligramas de alimento (WHO/FAO, 2011).

2.5 Fontes de Transmissão e principais reservatórios

Os principais alimentos responsáveis pela transmissão de *E. coli* O157: H7 são as carnes mal cozinhadas, nomeadamente a carne de bovino, o leite cru e o emprego de água contaminada para lavagem (Duffy et al., 2002). Legumes crus, tais como a alface e espinafre são igualmente alimentos que podem estar contaminados, assim como a manipulação inadequada de alimentos por pessoas infetadas também pode contribuir para a propagação da contaminação (Figura 2.2).

O trato gastrointestinal de bovinos e ruminantes tem sido considerado o principal reservatório desta estirpe (Manning et al. 2007; WHO/FAO, 2011). A carne é um meio ideal para o crescimento de microrganismos devido à sua composição, sendo constituída maioritariamente por água, proteínas (15-21%), gordura (0,5-25%), oligonutrientes e vitaminas (especialmente ricas em vitaminas do grupo B) (Hugas et al., 2002). É durante o abate que podem ocorrer inúmeras oportunidades de contaminação, sendo que algumas áreas da carcaça se

encontram mais propensas a esse facto. Fezes e peles de bovinos são consideradas fontes de contaminação das carcaças durante o abate, aquando a remoção da pele ou do trato gastrointestinal, sendo por esse motivo que a contaminação de carne com VTEC durante o abate é o principal veículo pelo qual estes microrganismos entram na cadeia de fornecimento de carne (Etcheverría et al., 2010). A carne moída é um importante meio de transmissão de *E. coli* O157:H7 devido muitas vezes às inapropriadas condições higiénicas do equipamento de moagem e das instalações onde a mesma é armazenada (Mittelstaedt e Carvalho, 2006).

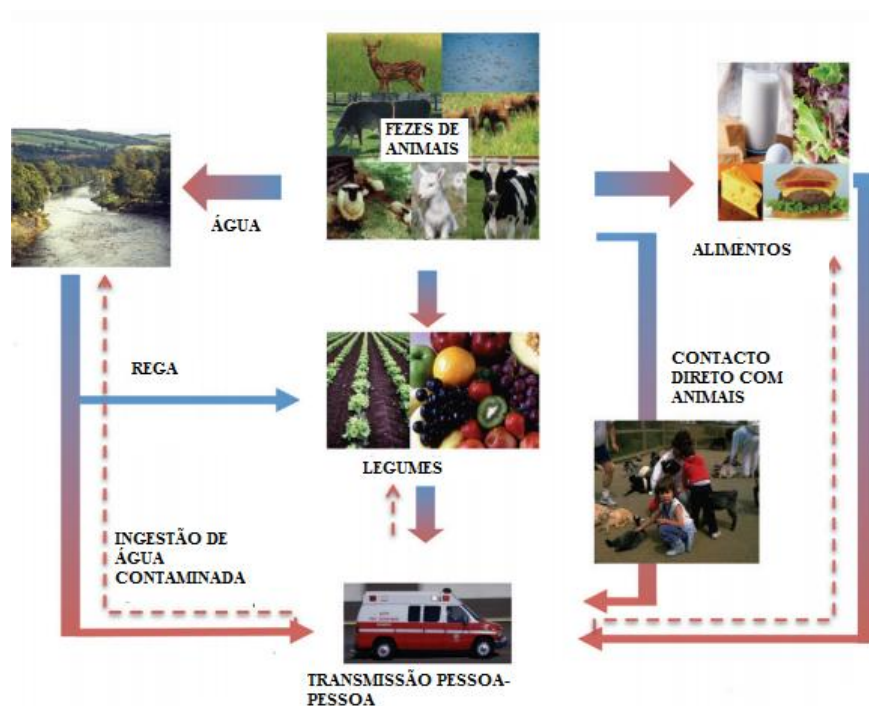


Figura 2.2 - Fontes de transmissão de *E. coli* O157:H7. Adaptado a partir de http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/FAO_E.Coli_FCC_2011.06.231.pdf

2.6 Fatores que afetam o crescimento

Como todas as bactérias, a sobrevivência e o crescimento de *E. coli* O157:H7 em alimentos depende da interação de vários fatores intrínsecos e extrínsecos, como a temperatura, pH, e atividade da água. No que diz respeito à temperatura, tal como mencionado anteriormente, esta estirpe não tem a capacidade de crescer a temperaturas acima dos 44°C.

Os valores de pH que possibilitam o crescimento da estirpe varia entre 5,5 e 7,5, sendo 4,0 o valor de pH mínimo para o crescimento desta bactéria. Vários estudos têm demonstrado que este agente patogénico consegue sobreviver durante várias semanas ou meses numa

variedade de alimentos ácidos, tais como maionese, salsichas, cidra de maçã e queijo Cheddar. (Clavero e Bleuchat, 1996; Buchanan e Doyle, 1997). Estudos sobre o efeito da atividade de água em relação à sobrevivência e ao crescimento desta estirpe têm-se focado primariamente no efeito do cloreto de sódio. Níveis elevados deste composto induzem a expressão do fator sigma RpoS (associado com o aumento da tolerância ao ácido). *E. coli* O157:H7 pode sobreviver durante semanas no alimento desidratado, particularmente em temperaturas de refrigeração (Buchanan e Doyle, 1997).

2.7 Mecanismo de Toxicidade

Vários estudos têm sido desenvolvidos em torno de *E. coli* O157:H7 assim como de outros serotipos que produzem citotoxinas com atividade frente a células Vero (verotoxinas) e células epiteliais, levando ao desencadeamento de doenças como o SUH e o síndrome entero-hemorrágico (Endo et al., 1988)

Como tem vindo a ser descrito, *E. coli* O157:H7 é o serotipo mais importante em relação à saúde pública, e uma das características encontradas nesta estirpe, mas não exclusivas destes organismos, é a sua capacidade de provocar *attaching and effacing* (A / E) e consequentemente provocar lesões no epitélio intestinal humano (Figura 2.3). Este tipo de lesões A / E são caracterizadas pela aderência bacteriana à membrana das células epiteliais com a consequente destruição das microvilosidades no local de aderência, tal facto decorre da síntese de uma proteína, uma adesina denominada de intimina. A intimina é codificada pelo gene *eae*, que faz parte de uma ilha de patogenicidade denominada *locus enterocyte effacement* (LEE) (Boerlin et al.,1999; Blanco et al., 2004; Rashid et al., 2006). Os genes da ilha LEE além de codificarem a intimina codificam ainda um sistema de secreção do tipo III (proteínas Esc e Sep); chaperoninas (proteínas Ces); proteínas translocadoras (EspA, EspB e EspD) e proteínas efetoras (EspF, EspG e Map), assim como o recetor para intimina (Tir) (Boerlin et al.,1999).

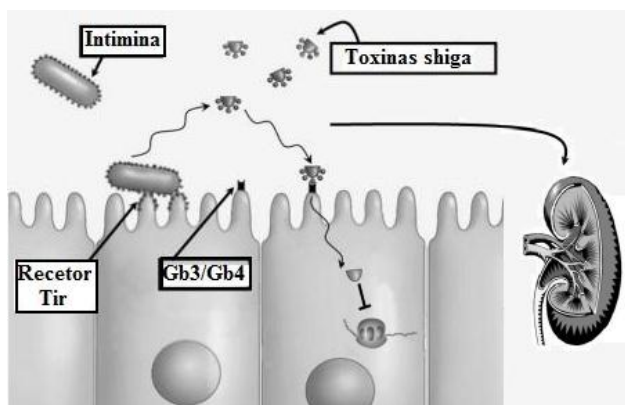


Figura 2.3 – Adesão de *E. coli* O157:H7 à mucosa intestinal. Adaptado de Rahal et al., 2012.

As toxinas produzidas por esta estirpe, como já referido anteriormente, são as toxinas Shiga – like (STX) ou verotoxinas (VT), sendo que têm esta designação devido ao seu grau de homologia estrutural e funcional com a toxina de *Shigella dysenteriae* tipo 1 (Bertão e Saridakis, 2007).

Existem dois membros principais da família de toxinas Shiga, a toxina Shiga 1 (STX1), que é essencialmente idêntica à da toxina Shiga produzida por *Shigella dysenteriae*, e toxina Shiga 2 (STX2), que tem apenas 56% de homologia com STX1 mas que são imunologicamente distintos, sendo este tema abordado adiante (Hurley et al., 1999).

2.8 Mecanismo de ação das toxinas Shiga

De um modo geral, as toxinas STX são libertadas no intestino, absorvidas através do epitélio intestinal, entram para a circulação, e são posteriormente transportadas para microcapilares de órgãos-alvo, principalmente, os intestinos, rins e cérebro. O dano do epitélio gastrointestinal, causado por EHEC ajuda na absorção sistémica da toxina. Quando estas toxinas atingem o órgão-alvo ligam-se a glicosíngolípidos, sendo abundantemente expressas nas células endoteliais glomerulares e microvasculares cerebrais. Tal processo desencadeia uma cascata complexa de eventos que culminam num episódio trombótico multi-orgânico. A globotriaosilceramida, ou Gb3, é um dos glicosíngolípidos presentes no epitélio de algumas células eucarióticas, sendo expresso por células de Paneth do intestino e por células epiteliais renais (Marejková et al., 2013).

Após a ligação ao recetor Gb3, a toxina é endocitada pela célula eucariótica, por via de um mecanismo dependente de clatrina (induz curvaturas na membrana do endossoma para formar túbulos retrógrados, sendo por isso um regulador crítico do transporte de STX do endossoma para o complexo de Golgi), através de um transporte retrógrado do complexo de Golgi para o retículo endoplasmático (RE), onde encontra o seu alvo, o ribossoma, inativando-o (Pacheco e Sperandio, 2012; Eierhoff et al., 2012). Como consequência, a STX inibe a síntese de proteínas, causando a morte celular por apoptose. Se a síntese de proteínas é completamente inibida ocorrendo eventualmente a morte das células, a toxina pode atravessar a barreira intestinal para mediar as complicações vasculares da doença, incluindo colite hemorrágica e síndrome urémico hemolítico (Creydt et al., 2004).

A toxina STX pode também ser translocada desde a membrana apical da célula até à superfície basolateral, com indução de interleucina-8 (IL-8), que contribui para a acumulação de leucócitos na parede intestinal. Deste modo, produzem-se danos nas células endoteliais e dos vasos sanguíneos provocando diarreia sanguinolenta (Rivas et al., 2008; Rahal et al., 2012).

Segundo Rivas e colaboradores os rins possuem elevados níveis de Gb3, principalmente na região cortical, tendo sido tal facto observado em doentes com SUH. As lesões histopatológicas ocorrem pela interação da toxina STX com células endoteliais dos vasos sanguíneos, que faz com que as células inchem e se libertem do glomérulo renal. Simultaneamente ocorre um depósito de fibrina e de plaquetas na microvasculatura renal ocasionando o bloqueio dos capilares e consequentemente uma redução do fluxo sanguíneo, provocando insuficiência renal e rutura dos glóbulos vermelhos do sangue. De acordo com os mesmos autores também foram observadas lesões trombóticas, especialmente na microvasculatura do intestino, cérebro e pâncreas (Rivas et al., 2008). Na figura 2.4 pode ser observado o mecanismo de toxicidade produzido por STX.

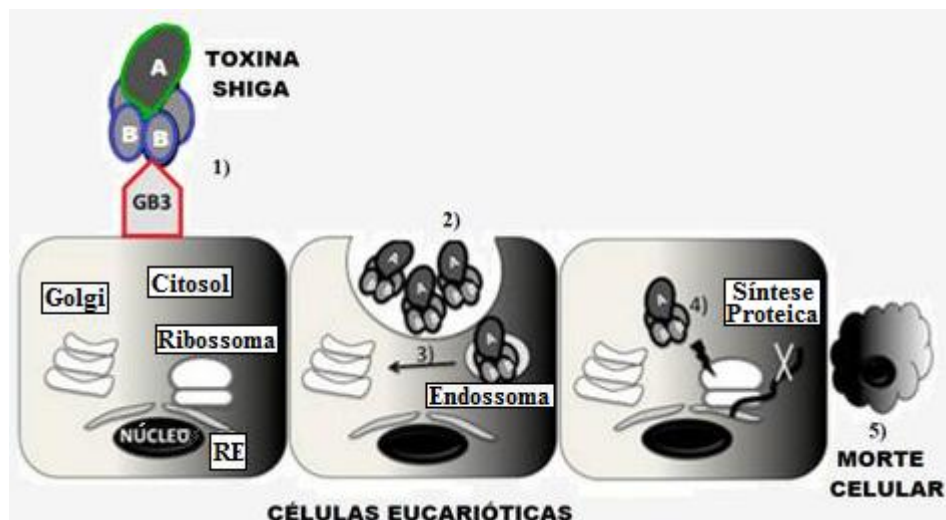


Figura 2.4 - Mecanismo de toxicidade da Toxina Shiga. Adaptado de Pacheco e Sperandio, 2012.

1) Ligação entre a sub-unidade B da STX com o glicoesfingolípido GB3; **2)** A toxina é endocitada pela célula por via de um mecanismo dependente de clatrina (induz curvaturas na membrana do endossoma para formar túbulos retrógrados; **3)** Transporte retrógrado do complexo de Golgi para o retículo endoplasmático (RE); **4)** A toxina encontra o seu alvo, o ribossoma, inativando-o; **5)** STX inibe a síntese de proteínas, causando a morte da célula por apoptose.

2.9 Fatores de Virulência

Entre os fatores de virulência mais importantes encontram-se as adesinas, que possibilitam aos microrganismos a colonização dos tecidos; as toxinas, as invasinas, os sistemas de captação de ferro, e os fatores que destroem as defesas do hospedeiro. Além disso, a aquisição de genes que permitem a resistência a antibióticos tornou-se um elemento adicional na virulência das bactérias (Vieira, 2009).

Escherichia coli O157:H7 adquiriu vários fatores de virulência que podem influenciar a sua patogenicidade. Três desses principais fatores foram identificados, incluindo uma ilha de patogenicidade denominada de LEE, que codifica os produtos associados, nomeadamente a proteína intimina, com a formação de lesões de *attaching and effacing* no hospedeiro, toxinas Shiga, STX, as quais inibem a síntese de proteínas em células eucarióticas, e o plasmídeo pO157, membro da família de exoproteínas RTX, responsável pela codificação de enterohemolisina (E-hlyA) entre outros (Blanco et al., 2004; Rashid et al., 2006; Ekta et al., 2010).

Outros estudos têm reportado a existência de diversos fatores de virulência associados ao desenvolvimento de doenças, tais como componentes lipopolissacarídicos (LPS) da estrutura bacteriana (endotoxinas), ou fatores representados por diferentes cito ou exotoxinas (hemolisinas, fator necrosante citotóxico (CNF), verotoxinas (VT), enterotoxinas), assim como propriedades que permitem a multiplicação em meios com restrição de ferro (sideróforos), a multirresistência aos antimicrobianos, ou a colonização celular (pili, adesinas ou fímbrias) entre outros (Ribeiro et al., 2006).

2.9.1 Toxinas: Shiga toxinas 1 e 2

Ambas as toxinas, STX1 e STX2, são toxinas multiméricas compostas por uma subunidade proteica A, associada a uma subunidade pentamérica idêntica B. A ligação da toxina a células é mediada pelas subunidades B, que se ligam ao recetor glicolípido globotriaosilceramida (Gb3) presente na membrana plasmática de certas células eucarióticas (Creydt et al., 2004; Pacheco e Sperandio 2012; Hurley et al., 1999). A subunidade A exibe a atividade catalítica de n-glicosidase, que atua através da remoção de uma base de adenina específica do rRNA 28 da subunidade ribossomal 60 S no interior das células infetadas (Fraser et al., 2004). De acordo com Pacheco e Sperandio, STX2 é mais potente que STX1 em humanos e está mais comumente associada com CH e SUH (Pacheco e Sperandio, 2012).

Embora o grupo de STX1 seja idêntico, o grupo de STX2 possui variantes. Essas variantes incluem STX2c, STX2d, STX2d-ativável, STX2e e STX2f. Apenas a variante STX2c de STX2 foi encontrada nos serotipos O157. As variantes STX2 são distinguidas por uma

diferença na atividade biológica, imunológica e reatividade, ou pelo recetor ao qual se ligam. STX1, STX2, e as variantes STX2 ligam-se preferencialmente ao Gb3 com exceção de STX2e, que se liga preferencialmente ao globotetraosilceramida (Gb4). Estas diferentes propriedades de ligação das toxinas determinam a sua capacidade em atingir diferentes células - alvo (Fraser et al., 2004).

2.9.2 Plasmídeo pO157

A maior parte dos patogénicos Gram-negativos contém plasmídeos, que frequentemente são determinantes para virulência de cada estirpe. São, portanto, moléculas de DNA extracromossómico capazes de se replicar independentemente do DNA cromossómico. São elementos móveis que fornecem várias características tais como a resistência a antibióticos e metais pesados, a produção de toxinas e outros fatores de virulência, biotransformações de hidrocarbonetos, e fixação simbiótica de azoto (Burland et al., 1998).

O plasmídeo pO157 foi encontrado em 99 a 100% de casos clínicos de *E. coli* O157: H7 isolada em seres humanos (Johnson e Nolan, 2009). Possui uma estrutura dinâmica e inclui diferentes elementos genéticos móveis, como transposição, profagos, sequências de inserção (SI), e partes de outros plasmídeos e é encontrado na maioria das estirpes de EHEC (Lim et al., 2010; Burland et al., 1998). O seu papel na patogenicidade ainda não está claramente definido, contudo vários estudos têm relacionado a sua presença com a virulência, como por exemplo, a atividade hemolítica e a adesão às células intestinais (Burland et al., 1998). Foi o caso do estudo conduzido por Tatsuno e colaboradores, em que foi investigado o papel de um plasmídeo de 93 kb (pO157) na adesão de *E. coli* O157:H7 onde foi encontrado o gene, *toxB*, que se verificou estar envolvido na adesão às células intestinais. Segundo estes autores o gene encontrado (*ToxB*) contribui para a adesão de EHEC a células epiteliais, através da promoção da produção e / ou secreção de proteínas secretoras do tipo III (Tatsuno et al., 2001).

Trinta e cinco proteínas estão presumivelmente envolvidas na patogénese de infeções por *E. coli* O157:H7, no entanto apenas 19 genes foram previamente caracterizados, incluindo genes que codificam a hemolisina (*ehxA*), catalase-peroxidase (*katP*), sistema de secreção do tipo II (ETP), serina protease (ESPP), uma adesina (*ToxB*), uma metaloprotease de zinco (STCE) e um fragmento conservado *eae* (ECF) (Lim et al., 2010). A codificação de hemolisina (exotoxina) foi a primeira sequência de pO157 a ser determinada (Burland et al., 1998).

2.9.3 Hemosilina

Tal como mencionado anteriormente, a codificação de hemosilina foi a primeira sequência de pO157 a ser determinada, passando tomar a designação de enterohemosilina (Chart et al., 1998; Law, 2000). As hemolisinas compõem uma família de toxinas, RTX (*repeats in toxin*), que podem desempenhar um papel chave na patogénese de doenças. Vários tipos de hemolisinas foram descritos, a partir de diferentes grupos patogénicos, sendo a α -hemolisina a melhor caracterizada (Schmidt et al., 1995). Embora a enterohemolisina esteja presente na maioria das estirpes de EHEC/STEC e a enterohemólise seja sugerida como um marcador para deteção de EHEC, a sua contribuição na patogenicidade de EHEC/STEC ainda não foi totalmente esclarecida (Bertrão e Saradakis, 2007), no entanto, segundo estudos esta toxina provoca a lise dos enterócitos, levando à libertação de hemoglobina que serve como fonte de ferro e estimula o crescimento do microrganismo (Bauer e Welch, 1996).

Algumas estirpes de *Escherichia coli* produzem α -hemosilinas e β -hemolisinas que são secretadas e associadas à célula, respetivamente. Ambos os tipos de hemolisina são expressos na fase exponencial de crescimento, mas apenas a α - hemolisina requer iões de cálcio para a atividade lítica (Chart et al., 1998).

Como na maior parte das proteínas RTX, um operão composto por quatro genes (hlyABCD) está envolvido na síntese de polipéptidos, na modificação pós - tradução e na secreção de α -hemosilina (HlyA) ativa no meio extracelular (Herlax et al., 2010).

2.9.4 Resistência ao ácido do estômago

Uma propriedade importante de patogénicos microbianos associados com a transmissão por via oral é a sua capacidade de sobreviver em ambientes extremamente ácidos (Lin et al., 1996).

A importância do suco gástrico para controlar o resultado de infeções de origem alimentar é bastante reconhecido. Para provocar doenças em humanos, um organismo invasor deve sobreviver ao ambiente ácido do estômago antes de atingir o intestino. Assim, a acidez do suco gástrico fornece uma primeira linha de defesa contra agentes patogénicos de origem alimentar (Benjamin e Datta, 1995).

A adaptação das células bacterianas no trato gastrointestinal de bovinos pode induzir o sistema de ácido-resistência em *E. coli* patogénicas e não patogénicas.

E. coli O157:H7 com sistema de ácido-resistência induzido pode permanecer resistente ao ácido nos alimentos por um determinado período. Uma vez ingeridos através do alimento contaminado, os organismos ácido - adaptados são capazes de sobreviver à defesa ácido - gástrica do hospedeiro humano e colonizar o intestino através de competição com os organismos comensais (Chung et al., 2006). Segundo Buchanan e Doyle, estirpes de EHEC

podem ter um grau elevado de tolerância ao ácido, conseguindo sobreviver praticamente inalteradas durante uma exposição de cerca de 2-7 horas em pH 2,5 a 37 °C (Buchanan e Doyle, 1997).

E. coli O157:H7 é considerado um dos serotipos mais ácido-resistentes e para o seu elevado nível de tolerância ao ácido, vários mecanismos podem estar envolvidos, dependendo da fase de crescimento das bactérias que se submetem ao stress ácido. O desenvolvimento da tolerância ácida pode ser dependente do pH, independente do pH, ou uma combinação de ambos os tipos (Chung et al., 2006). Claramente, a dose infetante (DI) de diferentes patogénicos entéricos corresponde às suas capacidades relativas para suportar o ácido (Lin et al., 1996).

Vários têm sido os estudos realizados relativamente à capacidade ácido-resistente (AR) de *E. coli* O157:H7. Esses estudos determinaram a existência de três sistemas AR altamente eficientes. O primeiro sistema de AR requer o fator sigma RpoS (a expressão de genes regulados pelo fator sigma RpoS está associada com o aumento da tolerância ao ácido, sendo que, devido a essa expressão as células de *E. coli* na fase estacionária de crescimento são substancialmente mais tolerantes do que as células em fase exponencial), o segundo sistema de AR requer a adição de arginina durante a exposição ao meio ácido e o terceiro sistema de AR requer glutamato para proteção quando os valores de pH são baixos (Lim et al., 2010; Buchanan e Doyle, 1997).

Segundo Lin e colaboradores uma vez induzidos, todos os três sistemas de AR estas bactérias podem persistir pelo menos um mês sob condições de refrigeração. A indução da tolerância ao ácido pode igualmente melhorar a capacidade de sobrevivência do organismo a outros stresses (Lin et al., 1996). Estudos recentes têm indicado que a indução de tolerância ao ácido também aumenta a resistência do microrganismo perante o aquecimento, radiação e agentes antimicrobianos (Buchanan e Doyle, 1997).

2.9.5 Ilha de Patogenicidade LEE

A ilha de patogenicidade LEE é um conjunto de genes envolvidos na adesão de agentes patogénicos nas células epiteliais intestinais, na iniciação das vias de transdução do sinal no hospedeiro e na formação de lesões de A/E (Perna et al., 1998), não se encontrando na flora normal de *E. coli* ou estirpes enterotoxigénicas de *E. coli*, mas sim em estirpes EPEC e STEC capazes de produzir lesão A/E (Silva, 2002).

Estes genes são organizados em três grandes regiões com funções distintas. Na região do meio encontra-se o gene *eae*, (responsável pela codificação de uma adesina, a intimina) e os genes que codificam o recetor Tir (recetor para a intimina) que é translocado para células hospedeiras através de um sistema de secreção do tipo III. Este sistema interfere com o

citoesqueleto facilitando a sobrevivência bacteriana, a sua replicação e o desenvolver da doença (Frankel et al., 1998; Gruenheid et al., 2004).

Também na região LEE encontram-se os genes *esc* e *sep* que codificam um sistema de secreção tipo III envolvido na secreção extracelular de diversas proteínas (EspA, EspB e EspD) codificadas por sua vez pelo gene *esp* (Perna et al., 1998).

A formação da lesão A/E caracteriza-se pela destruição das microvilosidades das células epiteliais intestinais e uma aderência íntima entre a bactéria e a membrana epitelial da célula. A intimina é a proteína da membrana externa bacteriana responsável pela aderência da bactéria às células epiteliais (Silva, 2002). Aquando a adesão das estirpes STEC às células epiteliais do intestino, começam a desencadear-se eventos de transdução de sinais que causam a fosforilação de proteínas celulares do hospedeiro e levam a um aumento do nível intracelular de cálcio e de inositol-trifosfato, o que acarreta à eliminação ("*effacement*") das microvilosidades. Diretamente abaixo do local de aderência da bactéria são observadas alterações no citoesqueleto celular, incluindo a acumulação de filamentos de actina, formando uma estrutura similar a um cálice ou pedestal, resultando tal facto devido a intimina (Gruenheid et al., 2004; Silva, 2002).

As proteínas EspS (EspA, EspB, EspD) são responsáveis pelo início dos eventos de transdução de sinais com atuação mediadora na interação inicial de STEC com as suas células alvo (Silva, 2002)

2.10 Epidemiologia

E. coli O157:H7, identificada pela primeira vez em 1982 nos Estados Unidos, em que a carne moída esteve implicada na origem do surto, tem sido desde então uma causa crescente de doenças transmitidas por alimentos no mundo inteiro e devido a essas doenças tem sido amplamente isolada e estudada.

De acordo com a literatura consultada, países como EUA, Canadá, Japão, Austrália, Argentina e Reino Unido são dos países que mais casos de infeções e surtos provocados por *E. coli* O157:H7 reportam. Devido à ocorrência de *E. coli* O157 nesses países, foram desenvolvidos métodos específicos para a sua deteção e confirmação, tornando este serogrupo um dos mais investigados e, de facto, o mais frequentemente encontrado (WHO/FAO, 2011).

Na maior parte dos surtos estiveram envolvidos o consumo de carnes mal cozinhadas, no entanto, foram registados outros tantos casos com diferentes alimentos como principal fonte de contaminação como se pode verificar mais adiante.

2.10.1 Incidência nos Estados Unidos

Nos Estados Unidos, o *Center for Diseases Control and Prevention* (CDC) estima que o número de doenças transmitidas por alimentos é anualmente cerca de 76 milhões de casos, resultando em 325.000 hospitalizações e 5.000 mortes. Destes, quase 14 milhões de casos de doenças transmitidas por alimentos, 60.854 internamentos e 1.800 mortes são causadas por patógenos de origem alimentar conhecidos (Mead et al., 1999).

No período de 1982 a 2002, 49 estados relataram 350 surtos referentes a *E. coli* O157:H7, o que representa 8.598 casos, 1.493 (17%) internamentos, 354 (4%) casos de SUH, e 40 (0,5%) mortes. Via de transmissão: 183 (52%) origem alimentar, 74 (21%) causa desconhecida, 50 (14%) transmissão pessoa - pessoa, 31 (9%) através do consumo de água, 11 (3%) por contacto animal, e 1 (0,3%) - relacionada com laboratórios (Rangel et al., 2005).

De acordo com Rangel e colaboradores o número de surtos notificados começou a aumentar em 1993 atingindo um pico em 2000 (46 surtos) (Rangel et al., 2005).

Em 139 surtos provocados por *E. coli* O157:H7, no período de 1982-1996, mais de 3000 pessoas adoeceram, onde 22% dessas pessoas foram hospitalizadas. Destas, 6% evoluíram para SUH ou PTT. Os casos de infecção por *E. coli* O157:H7 são mais comuns nos Estados do norte, sendo a incidência maior em crianças entre cinco e nove anos e adultos entre 50 e 59 anos e nos meses quentes do ano. No estado de Washington os estudos prospetivos apresentam um pico de incidência entre Junho e Setembro com 60% dos casos. Os fatores responsáveis por este comportamento sazonal estão ligados à ecologia do microrganismo nos bovinos e aos hábitos de consumo de carne bovina moída. Embora os surtos ligados a restaurantes tenham recebido mais atenção, o maior número de casos provavelmente resulta do tratamento térmico inadequado da carne moída no domicílio (Silva, 2002). Segundo Rangel e colaboradores, surtos associados à carne moída ocorreram mais frequentemente em larga escala ao nível das comunidades (48%), seguindo-se os piqueniques ou acampamentos (15%), residências individuais (11%), restaurantes (9%) e escolas (5%). Em 1995 foi reportado o último surto associado a hambúrgueres em restaurantes de fast food (Rangel et al., 2005).

A incidência de infeções provocadas pelo microrganismo varia de acordo com faixa etária, tendo sido notificados casos onde existe maior ocorrência em crianças. Além destas, os idosos são também suscetíveis a infeções. Embora os indivíduos nessas faixas etárias sejam mais vulneráveis, qualquer pessoa, independentemente da idade pode sofrer infeções causadas pela bactéria (WHO/FAO, 2003). Em 1987, o primeiro ano em que o estado de Washington exigiu que os casos de infeções causadas por *E. coli* O157:H7 fossem reportados, a maior taxa de incidência específica por idade encontrava-se em crianças de idade inferior a 5 anos (6,1 casos por 100.000 habitantes por ano) e a menor taxa de incidência para os adultos com idades compreendidas entre os 50-59 anos (0,5 casos por 100.000) (Ostroff et al., 1989).

A maior incidência de infecções em crianças pode, de certa forma dever-se à maior probabilidade destas serem levadas atempadamente para atendimento médico. A variação das taxas de incidência por idade pode também estar relacionada com a variação da exposição ao agente consoante a faixa etária do indivíduo. Os jovens e os idosos são mais propensos ao desenvolvimento de complicações graves devido às infecções por *E. coli* O157:H7, SUH e PTT. Consequentemente é entre os jovens e os idosos que existe maior morbidade e mortalidade ocasionadas por infecções pelo dito microrganismo (USDA, 1997).

Além das variações das infecções nas diferentes faixas etárias, outros estudos têm sido conduzidos sobre os fatores de risco que podem eventualmente estar associados com a progressão das infecções causadas por *E. coli* O157:H7 para o SUH. O uso de antibióticos, a duração prolongada da diarreia, elevada contagem leucocitária, diarreia sanguinolenta, e o sexo são exemplos desses fatores (Tserenpuntsag et al., 2005; Ikeda et al., 2000).

Segundo o CDC (*Center for Diseases Control and Prevention*), citado por Gansheroff e O'Brien, estima-se que estirpes de *E. coli* O157:H7 causam cerca de 73.000 doenças e 60 mortes por ano nos Estados Unidos (Gansheroff e O'Brien, 2000). A incidência global de infecções provocadas pelo agente patogénico em 2004 foi de 0,9 por 100 000 habitantes (WHO/FAO, 2011), no entanto, de acordo com Doyle e colaboradores, a incidência deste microrganismo diminuiu nos últimos anos, embora se tivesse verificado um ligeiro aumento em 2005 (Doyle et al., 2006).

Durante a década de 1980 a maioria dos surtos de *E. coli* O157:H7 foram associados a hambúrgueres inadequadamente cozinhados e leite não pasteurizado. No entanto, em surtos posteriores foram atribuídos como principal fonte de transmissão outros alimentos, tais como produtos lácteos produzidos a partir de leite não pasteurizado como foi o caso do queijo e iogurte, porém, foram também relatados casos de contaminação pós-pasteurização. Por sua vez a água tem sido igualmente relatada como uma fonte de infecção humana, incluindo-se as fontes de água potável contaminada com fezes de animais, lagos contaminados e piscinas (Doyle et al., 2006).

Frutas e vegetais são também citados como veículos de transmissão para o ser humano, devido à presumível exposição a material fecal utilizado muitas vezes como fertilizante ou devido à lavagem/irrigação destes alimentos com água contaminada. Em Maio de 1996, um surto envolvendo 47 casos em Illinois e Connecticut (EUA) apontou a alface como veículo de transmissão. A investigação epidemiológica indicou como provável causa do surto, a contaminação da verdura com fezes bovinas na fazenda de origem (Doyle et al., 2006; Silva, 2002). Já em 1996 um grande surto em vários estados americanos com 71 casos confirmados e um óbito teve como veículo de transmissão o sumo de maçã. Suspeita-se que maçãs caídas no solo foram contaminadas com adubo a base de esterco bovino (Silva, 2002).

Em Maio de 2009 foram detetados 17 casos de infeções originadas por *E. coli* O157:H7 associados com o consumo de massa comercial pré-embalada pronta para cozinhar. Foi a primeira vez que foi relatado um surto causado pelo agente patogénico neste tipo de matriz alimentar. Possíveis meios de contaminação incluem a introdução de um ingrediente contaminado durante o processamento, um lapso nas medidas de biossegurança das plantas utilizadas na confeção dos biscoitos, contaminação intencional, ou contaminação cruzada com outro alimento processado (Neil et al., 2011).

Em 1994, *E. coli* O157:H7 foi designada pelo Conselho de Epidemiologistas dos Estados e Territórios como uma doença de notificação obrigatória nos EUA (FAO/WHO, 2003).

2.10.2 Incidência no Canadá

Em muitas regiões do Canadá, *E. coli* O157:H7 é o segundo patogénico bacteriano mais comum encontrado nas fezes e submetido a análises laboratoriais, logo atrás de espécies como *Campylobacter* (Rowe, 1995).

No Canadá, infeções causadas por STEC foram notificadas pela primeira vez em 1990. A incidência anual de infeção variou entre 3-5,3 casos por 100 000 habitantes durante o período de 1990-1994 (WHO/FAO, 2011). A maior incidência foi observada em 1995 com 5,1/100 000 habitantes. No período de 1993 a 1995, 93% dos casos de STEC foram causados pelo serogrupo O157 e nos últimos anos tem-se verificado um declínio da incidência devido às atividades de controlo implementadas (Silva, 2002). Dos casos relatados no período de 1990 a 1995, mais de 40% foram registados em Ontário (Michel et al., 1999).

Em 1995 registou-se uma taxa de 365 internamentos por cada 1000 casos, com uma taxa de mortalidade de 39 por 1000 casos (Williams et al., 2000).

Entre 1999 e 2003, em média, 1.625 casos foram notificados anualmente no Canadá, compreendendo menos de um quarto da verdadeira incidência da doença. Os custos económicos associados à doença são elevados e a doença desenvolvida pode ser grave, estimando-se que 8% dos indivíduos sintomáticos irá desenvolver SUH (Currie et al., 2007).

Em 1998, foi confirmada a presença de *E. coli* O157:H7 após a ocorrência de 39 casos no sul de Ontário, que segundo a investigação elaborada por Williams e colaboradores, o salame Genoa fermentado e seco foi identificado como a fonte do surto, reforçando desta forma, a necessidade de subsistirem exigências de fabrico rigorosas para os produtos de carne fermentados (Williams et al., 2000).

Em Maio de 2000, perto de 160 pessoas foram hospitalizadas numa pequena comunidade agrícola em Ontário, com sintomatologia semelhante: diarreia sanguinolenta, vómitos, cólicas severas e febre. Posteriormente, através de várias investigações da unidade de saúde local, foi determinada a causa das doenças sendo a ingestão de água contaminada com

matéria fecal proveniente de um poço o veículo de transmissão de *E. coli* O 157:H7, oriunda da presença de gado bovino naquela região (Ali e Pappa, 2004).

As infeções por STEC no Canadá têm padrão sazonal com maior frequência nos meses de verão e maior incidência em áreas rurais, observando-se uma correlação com a densidade da população bovina. A causa do aumento da incidência da doença durante os meses de verão é desconhecida, embora esteja presumivelmente relacionada de algum modo com um aumento da temperatura ambiente. É possível, por exemplo, que a temperatura ambiente elevada favoreça a multiplicação de STEC no ambiente rural e em produtos alimentares durante o processamento, distribuição e preparação para consumo (Michel et al., 1999).

2.10.3 Incidência na Europa

Tal como nos restantes países abordados anteriormente, também na Europa têm sido registados vários surtos provocados por *E. coli* verotoxigénicas ao longo dos anos, sendo retratados mais adiante os dados mais recentes para o continente europeu.

Em 2004, um total de 4.143 casos de infeções provocadas por STEC em humanos foram confirmados em laboratório, tais factos foram relatados em 17 países da UE e na Noruega. A incidência na União Europeia foi de 1,3 casos por 100 000 habitantes. A grande maioria das infeções por STEC incluíram diarreias como manifestação clínica (ou seja, não ocorriam manifestações de SUH), enquanto as infeções por STEC com manifestações de SHU foram significativamente menos frequentes (WHO/FAO, 2011).

Na tabela abaixo indicada podem verificar-se os casos referentes a infeções provocadas por STEC.

Tabela 2.1 - Casos de infeções STEC em seres humanos confirmados laboratorialmente na Europa em 2004. Adaptado a partir de WHO/FAO (2011)

País	Infeções por VTEC sem manifestações de SUH		Infeções causadas por VTEC com manifestações de SUH	
	Casos de VTEC por 100 000 habitantes	% causada por O157	Casos de VTEC por 100 000 habitantes	% causada por O157
Áustria	0,6	29	0,12	90
Bélgica	0,3	56	<0,1	100
República Checa	17,1	18	-	-
Dinamarca	3	27	<0,1	60
Estónia	0	0	0	0
Finlândia	0,2	40	-	-
França	-	-	0,1	82
Alemanha	1,1	10	<0,1	67
Grécia	-	-	0,76	-
Hungria	<0,1	71	<0,1	0
Irlanda	1,4	88	0,1	50
Itália	0	100	<0,1	24
Polónia	0,2	99	-	-
Portugal	-	(3 casos)	-	(1 caso)
Eslováquia	0,3	0	-	-
Eslovénia	0,1	-	-	-
Suécia	1,7	-	<0,1	100
Holanda	0,2	100	<0,1	100
Reino Unido	1,5	99	<0,1	95
Total União Europeia	1,3		<0,1	
Noruega	0,3	7	<0,1	100

Segundo os dados fornecidos pela tabela 2.1, a presença de *E. coli* O157 em todas as infecções (independentemente de haver manifestações de SUH ou não) varia de país para país (desde os 0% aos 100%), não havendo uma compreensão clara das razões subjacentes a este fenómeno, podendo tal caso dever-se a múltiplos fatores (WHO/FAO, 2011).

No caso de Portugal, mais concretamente, pode verificar-se que em 2004 registaram-se apenas 3 casos de manifestações de doenças (sem manifestações de SHU) provocadas por *E. coli* O157 e um caso de SUH, também ele provocado pela mesma estirpe. De acordo com a Portaria nº1071/98 de 31 de Dezembro onde consta a tabela das doenças de declaração obrigatória em Portugal, não faz parte do referido grupo infecções ou patologias decorrentes de infecções provocadas por EHEC, incluindo *E. coli* O157:H7, pelo que tal facto pode contribuir para o registo do número tão baixo de casos reportados para o período de 2004. Não só em Portugal mas também em outros países o mesmo pode suceder, além disso as técnicas utilizadas no rastreamento dos casos podem diferir de país para país, o que torna determinados dados pouco conclusivos.

Na Europa continental o primeiro caso de infeção por *E. coli* O157:H7 foi identificado em 1987 na Bélgica. Desde então este microrganismo tem sido isolado em inúmeros países (Silva, 2002).

Segundo Pennington, a incidência de *E. coli* O157 é significativamente mais elevada no Reino Unido em comparação com a maioria dos outros países europeus. Estudos sobre o SUH em Inglaterra e País de Gales mostram que 12% dos casos de infeção por STEC evoluem para SUH (Pennington, 2009).

O número de casos de infeções por *E. coli* O157 no Reino Unido confirmados em laboratório aumentou de 1 em 1982 para 1039 em 1995. O aumento de incidência observado na última década deve-se à melhoria dos meios de diagnóstico e vigilância, mas também provavelmente, a um aumento real da frequência, uma vez que o número de surtos aumentou. Em 1996 a incidência de infeções provocadas pela estirpe em Inglaterra e País de Gales foi de 1,29/100000 habitantes enquanto em 1990 foi de 0,49/100000 com uma incidência média anual de 1,5/1000. Na Escócia a incidência anual de infeções variou de 2,24/100000 em 1992 a 9,85/100000 em 1996, uma incidência média anual de 5,0/100000 (Silva, 2002).

Em 1982-1983, 35 crianças da região de West Midlands desenvolveram SUH, sendo esta uma incidência maior do que esperado e que incluiu uma epidemia localizada em Wolverhampton, que foi composta por 11 casos em apenas duas semanas. Vinte e três crianças foram submetidas a tratamentos de diálise, das quais três morreram. Seis desenvolveram insuficiência renal crónica, quatro delas de Wolverhampton. Foram igualmente registadas manifestações extra-renais durante o referido surto, das quais fizeram parte sequelas neurológicas em quatro crianças, onde duas delas também desenvolveram diabetes mellitus tipo

1 e insuficiência renal crónica. Uma criança desenvolveu cardiomiopatia e insuficiência renal crónica (Taylor et al., 1986).

Em 2005, no Reino Unido, a taxa de infeção de *E. coli* O157 foi de 2,0 por 100.000 habitantes, valor este próximo do valor nos EUA, com 1,05 casos. No entanto, os alimentos que transmitem a infeção nos EUA são substancialmente diferentes, assim como algumas das medidas de controlo. Em 2006, o Reino Unido foi responsável por 78% de todos os casos de *E. coli* O157 na Europa (Pennington, 2009).

Na Irlanda do Norte, registou-se um aumento acentuado de relatos de *E. coli* O157:H7 em laboratórios, de 1995 até a 2000, onde as infeções quase duplicaram nesse período (Watabe et al., 2008).

A maior proporção de casos de SUH no Reino Unido é causada pela estirpe em questão, embora outros serotipos estejam também envolvidos (Silva, 2002).

2.10.4 Incidência no Japão

No Japão, segundo a WHO/FAO num relatório publicado em 1999, seis surtos (946 casos) de *E. coli* O157 e 4 surtos (445 casos) de infeções provocadas por estirpes não-O157 ocorreram durante 1984-1995. Em apenas um ano (1996), denotou-se um grande aumento de surtos causados por *E. coli* O157:H7 (23 surtos: 8.456 casos e um surto de não-O157 (6 casos)). Depois disso, as infeções causadas por EHEC em 1997 e 1998, diminuíram para 1532 e 1380, respetivamente (WHO/FAO, 2011).

Entre Maio e Agosto de 1996, cerca de 10.000 casos de infeções associadas a *Escherichia coli* O157:H7 foram notificados, sendo estes registados em 14 grupos separados. A maioria dos casos ocorreu em crianças em idade escolar (Watanabe et al., 1999). Um desses grupos reportados diz respeito ao maior surto provocado pela estirpe registado na cidade de Sakai no Japão, em Julho de 1996, envolvendo mais de 7.000 pessoas (Mermin e Griffin, 1999; Watanabe et al., 1999). De acordo com a investigação de Michino e colaboradores, a causa mais provável do surto de Sakai deveu-se ao consumo de rabanetes brancos. Segundo os mesmos autores as fontes de infeção foram merendas escolares servidas nas escolas primárias e creches (7.470 indivíduos), refeições preparadas em lares de idosos (123 indivíduos), uma refeição servida num estabelecimento industrial (47 indivíduos), uma lancheira preparada comercialmente (191 indivíduos) e uma origem desconhecida (69 indivíduos). As escolas japonesas têm um único sistema de almoço: O mesmo menu é preparado para todas as escolas em cada área ou em cada escola, proporcionando um meio em que as crianças são infetadas simultaneamente (Michino et al., 1999). O mecanismo de contaminação dos rabanetes não foi determinado, no entanto, presume-se que estes possam ter sido contaminados através da utilização de sementes contaminadas para o crescimento, durante o crescimento ou durante o

transporte para os estabelecimentos de venda. Possíveis fontes de contaminação durante a germinação ou durante o transporte podem dever-se por exemplo a um trabalhador infectado ou pela contaminação fecal da água proveniente de animais (Mermin e Griffin, 1999).

2.10.5 Incidência em países da América do Sul

Na América do Sul infecções provocadas por *E. coli* O157:H7 concentram-se mais a Sul em países como Argentina, Chile e Uruguai, que segundo Rivas e colaboradores este facto pode dever-se a diferenças na distribuição geográfica, resultado do tamanho dos reservatórios do agente patogénico e a influência do mecanismo de transmissão específico em cada área. Segundo os mesmos autores a taxa de incidência de SUH na Argentina é o dobro do Uruguai e três vezes maior que no Canadá, EUA e Chile (Rivas et al., 2008).

A frequência de EHEC e, mais especificamente do SUH, parece ser mais elevada na Argentina com estimativas de cerca de 22 casos de SUH por 100 000 crianças dos 6 aos 48 meses (INFOSAN, 2007). Ambos os sexos são igualmente afetados e os casos são comuns em grupos de classe socioeconómica média, sendo portanto, crianças bem nutridas e que vivem em boas condições sanitárias (Reilly, 2008).

Segundo a Organização Pan-Americana de Saúde, citado por Marzocca e colaboradores o SUH é endémico na Argentina, cerca de três centenas de novos casos são relatados anualmente pelas unidades de nefrologia dos hospitais (Marzocca et al., 2006). Lopez e colaboradores (1998), citado por Silva (2002), sugerem que uma possível explicação para esta situação epidemiológica é o consumo de carne bovina na Argentina, uma vez que é a proteína de origem animal mais barata no país, o que faz da Argentina o maior consumidor deste alimento com um consumo de 60 Kg/habitante/ano. As crianças argentinas consomem carne bovina muito cedo, 20% aos 5 meses de idade e 80% delas comem carne três vezes por semana. Cerca de 80% da carne consumida no país é consumida sem tratamento térmico adequado.

2.11 Diagnóstico e Tratamento das infecções causadas por *E. coli* O157:H7

O tratamento das intoxicações deve ser feito apenas prevenindo e tratando a desidratação e os distúrbios hidroeletrólíticos, adotando medidas que visem o controlo dessas alterações fisiopatológicas que poderão eventualmente piorar a doença. Os sintomas geralmente tendem a desaparecer entre cinco a dez dias, no entanto, nos casos em que se desenvolve diarreia sanguinolenta, deve ser procurada assistência médica imediata. Nos casos mais graves de insuficiência renal deverá efetuar-se diálise peritonial. Uma atenção cuidada à ingestão de sal e água é extremamente importante, pois doentes desidratados com diarreia e vômitos devem ser hidratados, ainda assim, poderão desenvolver oligúria pelo que a hiperhidratação deve ser evitada. A nutrição deve ser mantida porque os pacientes com SUH têm uma elevada taxa de catabolismo e, para evitar um equilíbrio azotado negativo, a administração de glúcidos e aminoácidos é recomendada (Kaplan et al., 1998; Rivas et al., 2008).

De acordo com a literatura, este tema respeitante ao tratamento de infecções causadas por *E. coli* O157:H7 tem gerado alguma controvérsia, nomeadamente no que diz respeito ao uso de antibióticos.

Segundo alguns estudos realizados, os antibióticos, tal como o sulfametoxazol-trimetoprim, podem provocar a lise das paredes das células bacterianas, no entanto, tal facto pode levar à libertação das toxinas shiga e/ou causando um aumento da expressão destas toxinas *in vivo*, não sendo por esse motivo, recomendados no tratamento de infecções por STEC O157. Tudo leva a crer que o recurso à antibioticoterapia com o composto anteriormente mencionado seja um factor que proporciona um risco aumentado de evolução para SUH. (Rivas et al., 2008; Wong et al., 2000; Schroeder et al., 2002).

Num estudo efetuado por Wong e colaboradores, envolvendo crianças infetadas por *E. coli* O157:H7, foi demonstrado que as crianças que tomaram antibióticos durante a fase de diarreia foram mais propensas ao desenvolvimento de SUH e oligonúria do que aquelas que não receberam esse tipo de tratamento. A associação entre a exposição ao sulfametoxazol-trimetoprim ou metronidazol, dois dos antibióticos utilizados, e o desenvolvimento de SUH foram estatisticamente significativos, sendo que a administração dos antibióticos na primeira semana de infeção triplicou o risco de desenvolvimento de SUH (Wong et al., 2000).

Ainda assim, estudos recentes sugerem que alguns antibióticos se administrados precocemente no curso da infeção podem prevenir a progressão da doença para SUH (Rivas et al., 2008; Wong et al., 2000).

O diagnóstico é feito geralmente pela pesquisa de bactérias nas fezes do paciente e a sua identificação por métodos fenotípicos ou moleculares. As amostras de fezes devem ser inoculadas em Agar McConkey contendo sorbitol, uma vez que esta estirpe não fermenta ou fermenta muito lentamente este substrato. Para a pesquisa dos genes responsáveis pela

codificação das toxinas libertadas e genes responsáveis pela lesão A/E pode recorrer-se a sondas específicas de DNA ou à técnica de PCR. A serologia para a identificação do serogrupo baseia-se na presença de antígenos de natureza polissacarídica e lipopolissacarídica localizadas na parede da bactéria, também denominados de antígenos somáticos O, assim como pode igualmente ser utilizada para a determinação do serotipo de outras estruturas antigénicas como flagelos, também designados de antígenos H. Os diferentes antígenos são identificados através de testes de aglutinação, utilizando-se anti-soros preparados em coelhos (Mittelstaedt e Carvalho, 2006).

2.12 Prevenção

Na sociedade moderna, a cadeia alimentar é bastante complexa, tendo ocorrido várias mudanças nas preferências dos consumidores ao longo do tempo. Os membros envolvidos em cada etapa da cadeia alimentar, produtores, processadores, distribuidores, fornecedores e consumidores, têm a responsabilidade de garantir que o risco de contaminação por STEC é minimizado (FSAI, 1999).

De um modo geral, a prevenção de doenças veiculadas por alimentos deve basear-se em boas práticas de controlo da contaminação de alimentos, quer seja de origem biológica ou química. Isto pode ser conseguido de forma mais eficaz através da aplicação de programas de garantia de segurança alimentar, com base nos princípios da Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo (HACCP) (Reilly, 1998). Este plano de medidas de controlo e prevenção procura a produção de alimentos inócuos, sustentado na aplicação de princípios técnicos e científicos na produção e manuseio dos alimentos desde o campo até a mesa do consumidor (Batista et al., 2003). Na tabela abaixo indicada podem ser observadas algumas medidas preventivas de controlo de infeções por *E. coli* O157:H7.

Tabela 2.2 - Medidas preventivas de controlo de infeções por *E. coli* O157:H7.
Adaptado a partir de Food Safety Authority of Ireland (1999)

ETAPAS	MEDIDAS PREVENTIVAS
PASTO	<ul style="list-style-type: none"> - Devem ser efetuadas campanhas para agricultores de forma a aumentar a consciencialização sobre a doença grave causada por STEC; - Devem ser estabelecidas boas práticas de criação animal para garantir a produção de gado nas devidas condições; A vigilância deve ser realizada para determinar os níveis de STEC nos animais; - O estrume dos animais deve ser gerido de forma a evitar a contaminação do abastecimento de água ou frutas e legumes prontos-a-comer; leite não pasteurizado não deve ser consumido.
ABATE	<ul style="list-style-type: none"> - Nos matadouros deve garantir-se que só é aceite gado limpo para abate; - As carcaças devem ser devidamente limpas, não havendo qualquer tolerância para contaminação fecal visível em carcaças e miudezas; - Implementação de um correto Sistema HACCP.
PROCESSAMENTO	<ul style="list-style-type: none"> - Os alimentos crus e cozidos devem ser separados fisicamente em todos os momentos durante o processamento, armazenamento, distribuição; - Deve haver um processo contínuo de educação para a segurança alimentar e consciência no trabalho; - A carne picada e produtos de carne picada devem ser rotulados para facilitar a rastreabilidade; - Legumes e saladas, preparados como alimentos prontos - a - comer, devem ser devidamente lavados com as melhores condições de higiene; - Boas condições dos equipamentos de pasteurização; - Implementação de um correto Sistema HACCP.
VENDA	<ul style="list-style-type: none"> - Os alimentos crus e cozidos devem ser separados fisicamente em todos os momentos durante o armazenamento e exibição para o consumidor; - Devem adotar-se temperaturas apropriadas no armazenamento e cozedura de alimentos; - Os vendedores devem assegurar que a carne picada e produtos à base de carne são fornecidos para consumidores com a manipulação clara e instruções de cozimento.
CONSUMO	<ul style="list-style-type: none"> - Programas de consciencialização do consumidor sobre o manuseio e higiene alimentar, destacando a importância da prevenção da contaminação cruzada, controlo da temperatura de confeção (entre 68°C e 70°C) e o correto armazenamento dos alimentos; - Educação em higiene alimentar deve ser promovida no período escolar.

2.13.1 Métodos Convencionais para detecção de *E. coli* O157:H7

Os métodos convencionais apresentam 5 etapas – o enriquecimento seletivo, o plaqueamento diferencial, a confirmação serológica e bioquímica e confirmação da produção de verotoxinas. A principal diferença entre eles são a seleção dos meios de cultura e plaqueamento seletivo diferencial e a seleção dos testes bioquímicos utilizados na confirmação (Silva, 2004).

Os meios de enriquecimento são utilizados de forma a melhorar a detecção específica do organismo através do fornecimento de nutrientes que permitem uma maior produção de colónias. Desses meios podem incluir-se o caldo triptona de soja (TSB) modificada, suplementado com novobiocina ou acriflavina, água peptonada tamponada suplementada com vancomicina, cefixima e cefsulodina (Saad, 1997).

Agar MacConkey Sorbitol (SMAC) é o meio seletivo mais comumente utilizado para detecção de *E. coli* O157:H7 diferenciando-se do Agar MacConkey tradicional ao substituir lactose por sorbitol (March e Ratnam, 1986). As exigências nutricionais são similares a várias outras estirpes de *Escherichia coli*, no entanto, *E. coli* O157:H7 não fermenta o sorbitol em 24 horas e no caso de estar presente numa determinada amostra, colónias incolores aparecerão enquanto outras enterobactérias vão surgir como colónias rosa no referido meio (Deisingh e Thompson, 2004).

Ao longo dos anos estes meios convencionais têm vindo a sofrer algumas modificações de maneira a tornarem-se cada vez mais específicos na detecção de determinadas estirpes patogénicas. Como exemplo disso está o caso da inclusão da ramnose e do antibiótico cefixima no meio SMAC. Quando a ramnose é adicionada ao referido meio este passa a ser denominado CR-SMAC, permitindo a inibição de outros organismos que também não fermentam o sorbitol, uma vez que cerca de 60% desses organismos não fermentam a ramnose. Quando se adiciona cefixima ao meio este antibiótico inibe o crescimento de *Proteus* spp. Outra modificação realizada no SMAC, inclui além do cefixima o telurito de potássio, criando o meio CT-SMAC. Este inibe a multiplicação de outras *Escherichia coli*, permitindo o crescimento apenas do serotipo O157:H7 (Pigatto, 2004).

De acordo com a literatura, têm sido relatadas algumas propriedades incomuns que permitem a distinção entre STEC O157 e outras *Enterobacteriaceae*. Desta forma, após o isolamento das colónias nos meios seletivos procedem-se a testes bioquímicos e serológicos de confirmação. Testes de produção de indol, da urease e do citrato, são exemplos de testes bioquímicos que podem ser utilizados na identificação. Podem ser utilizados kits específicos com outros testes de confirmação (Vernozy-Rozand, 1997). Quanto aos testes serológicos, a confirmação do grupo serológico O157 é feita pelo teste padrão de aglutinação em lâmina ou utilizando-se os “kits” de aglutinação em látex. As reações de aglutinação em latex são simples e fáceis de utilizar, e são usados para detetar a presença de qualquer anticorpo ou antígeno numa amostra. Estes estão ligados a partículas de látex e, se o antígeno ou anticorpo

correspondente está presente, as partículas de látex vão aglutinar quando misturadas com a amostra a ser investigada (Deisingh e Thompson, 2004).

Estes métodos tradicionais de detecção, embora sejam eficientes, requerem vários dias ou semanas para disponibilizar os resultados definitivos.

2.13.2 Separação imunomagnética

Com o evoluir da ciência e consequentemente das novas tecnologias têm sido desenvolvidos novos métodos, mais rápidos, mais específicos e mais viáveis para a detecção de estirpes patogénicas, exemplo disso é a separação imunomagnética (IMS). É um método em que são utilizadas esferas magnéticas revestidas com anticorpos anti-O157 e são adicionadas em meios de enriquecimento. *E. coli* O157:H7 é capturada pelas partículas magnéticas e o complexo inteiro é removido pela aplicação de um campo magnético (Silva, 2002; Deisingh e Thompson, 2004). Esta técnica é vantajosa relativamente aos métodos tradicionais pois a especificidade do anticorpo, juntamente com as propriedades magnéticas das partículas permitem que o organismo alvo seja separado de fragmentos da matriz e de outros microrganismos existentes na mesma. É uma técnica versátil pois as partículas imunomagnéticas podem ser colocadas diretamente num meio seletivo ou serem usadas como um suporte sólido para um teste ELISA (Tu et al., 2009).

2.13.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)

A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) é um grande avanço no diagnóstico molecular de microrganismos patogénicos, isto porque o DNA de uma única célula bacteriana pode ser amplificado em pouco tempo (cerca de 1 hora) (Deisingh e Thompson, 2004). Por conferir resultados rapidamente e por ser uma técnica bastante precisa, tem vindo a ser amplamente utilizada na detecção de *E. coli* O157:H7.

De acordo com O'Sullivan, citado por Silva (2004), a técnica de PCR, na sua forma mais simples, é utilizada para amplificar sequências específicas de DNA inúmeras vezes, usando uma polimerase termoestável, deoxinucleotídeos (dNTP) e dois iniciadores, cujas sequências são complementares entre si e à sequência alvo ("template"). A amplificação é obtida aplicando-se múltiplos ciclos de PCR, geralmente 30 a 40 e, durante cada ciclo, ocorre a seguinte sequência de reação: aquecimento a aproximadamente 94°C, para desnaturar a cadeia dupla do DNA, arrefecimento a menos de 55°C (condição típica), para que os iniciadores hibridem com as sequências que lhes são complementares nas cadeias simples obtidas, reaquecimento a 72°C para que a polimerase sintetize a cópia do DNA na região entre os dois iniciadores. Como cada fragmento gerado se torna o alvo do próximo ciclo de PCR, a

amplificação é exponencial e uma simples cópia pode ser potencialmente amplificada a 2^n , onde “n” é o número de ciclos de PCR (Silva, 2004). Apesar de permitir obter milhões de cópias de um segmento específico de DNA pela ação da enzima Taq DNA polimerase e de primers sobre um DNA molde apresenta uma desvantagem que reside no facto desta técnica não ser capaz de discriminar as células viáveis das células não viáveis, impedindo uma análise concreta do potencial risco para saúde por parte dos microrganismos num dado alimento (Oliveira, 2012).

2.14 Ensaios Imunológicos: ELISA

Os métodos imunológicos desenvolvidos para quantificar a concentração de antígenos e anticorpos, por apresentarem grande sensibilidade e especificidade, tornaram-se técnicas padronizadas para pesquisa e aplicações clínicas. O mais conhecido e utilizado ensaio imunológico é o teste ELISA. É um teste rápido utilizado para a deteção e quantificação de anticorpos ou antígenos contra vírus, bactérias e outros materiais. De um modo geral, após incubação do soro de teste num tubo ou placa de poliestireno revestidas com antígeno, é adicionada anti-imunoglobulina marcada com uma enzima, a qual após a lavagem, permanece no tubo ou placa proporcionando uma quantidade específica do anticorpo no soro. O teste baseia-se na insolubilização do antígeno por adsorção passiva na fase sólida (superfície de poliestireno). A mesma abordagem pode ser utilizada para a deteção de antígenos (WHO, 1976).

3 A Empresa

Fundada originalmente em 1878 em Rouen como um entreposto Francês para a inspeção do comércio internacional de cereais a granel, a companhia foi registada como Société Générale de Surveillance em 1919, em Genebra. Atualmente a SGS    a maior organiza  o mundial no domínio da Inspe  o, Verifica  o, Análise e Certifica  o, com sede em Genebra, Suíça esta empresa está presente em cerca de 140 países, com o logotipo apresentado na Figura 3.1, operando em mais de 1.500 escritórios e laboratórios, contando com 80.000 colaboradores em todo o mundo.

Em Portugal, a SGS foi fundada em 1922, pelo grupo SGS, tendo estabelecido que esta afiliada (SGS Portugal) desenvolvesse a sua atividade sempre associada a valores como a Independência, a Integridade, a Confidencialidade e a Inova  o.

Originalmente, a SGS Portugal encontrava-se “dedicada” ao controlo de opera  es de carga e descarga de cereais a granel, posteriormente foi alargando a sua atividade a outros setores adaptando-se às exigências do mercado. Os serviços abrangem inspe  es, análises e ensaios, verifica  o metrológica acreditada, inspe  es e auditorias técnicas nos mais diversos ramos.

O “laboratório agroalimentar SGS” foi criado em 1989 com o objetivo de proporcionar suporte ao controlo de opera  es de cereais. Desse momento em diante, iniciou-se o desenvolvimento de análises microbiológicas clássicas, possuindo agora uma posi  o possante e sólida no mercado, a nível de análises nutricionais. Na atualidade, a empresa possui diversos laboratórios qualificados nas áreas agroalimentar, ambientais, segurança ocupacional, detergentes, produtos de higiene e cosméticos, dispositivos médicos e Ensaio não Destrutivos, assegurando que os seus produtos satisfazem os parâmetros internacionais, defendendo a segurança do consumidor.

O laboratório alimentar da SGS    composto pela sala de rece  o de amostras, laboratório de química e laboratório de microbiologia onde decorreu o estágio.

Na figura 3.1 encontra-se representado o logotipo da empresa.



Figura 3.1 - Logotipo da Empresa.

Para a implementação de métodos é necessária a realização de análises de rotina laboratorial utilizando o novo método em paralelo com a norma de referência correspondente. Nos ensaios interlaboratoriais quando existentes, ambos os métodos deverão ser utilizados de forma a validar o método a implementar. Caso o método a implementar seja referente a contagens, os resultados deverão ser analisados de forma a obter resultados dentro do mesmo ciclo logarítmico. Para a implementação de métodos deverão ser feitas análises em paralelo em pelo menos 10 amostras, tendo como critério de aceitação:

- **Nas contagens:** os resultados deverão estar dentro do mesmo ciclo logarítmico;
- **Nas pesquisas:** os resultados deverão ser concordantes.

No caso em que a norma ou procedimento faça referência à validação da mesma, esta deverá ser seguida.

De acordo com o Instituto Português de Acreditação (IPAC) a experiência adquirida nos últimos anos na aplicação dos requisitos da Norma NP EN ISO/IEC 17025 e guia EA-04/10, com a recente publicação e normas relacionadas com esta atividade tornaram-se necessárias que se definissem as estratégias de avaliação dos laboratórios de microbiologia.

A validação de um método é a confirmação, através da análise e da apresentação objetiva, de que os requisitos específicos relativos a uma dada utilização são cumpridos. A validação de um método permite demonstrar que o método é adequado ao uso pretendido e deve ser adaptada caso a caso, sendo progressivamente mais exigente para as seguintes situações: 1- Extensões e/ou modificações de métodos normalizados; 2-Métodos normalizados utilizados fora do âmbito de utilização prevista; 3-Métodos Não Normalizados; 4-Métodos criados e desenvolvidos pelo próprio laboratório.

Prende-se que, na validação dos métodos microbiológicos, todas as regras gerais sejam cumpridas em toda a execução dos ensaios laboratoriais ajudando assim a obter resultados comparáveis com outros laboratórios. Este facto contribui para a segurança dos técnicos de laboratório, prevenindo assim riscos de infeção.

No presente trabalho foram realizadas pesquisas de *E. coli* O157:H7 segundo o método horizontal de deteção (ISO 16654:2001) e dois métodos já implementados na empresa de forma a verificar a concordância entre estes, como referido mais adiante.

Durante o estágio curricular, as amostras de produtos alimentares analisadas, não foram recolhidas pelo estagiário pelo que todas as amostras manuseadas pelo mesmo são amostras que pertencem a clientes que trabalham com o laboratório de microbiologia da SGS. Qualquer tipo de informação (origem do produto, local da recolha, estabelecimento a que pertencia a amostra, etc.) que ponha em causa a integridade da empresa não será divulgado nesta dissertação. A SGS respeita e protege a informação confidencial que lhe é confiada pelos clientes e terceiros e toma medidas adequadas para evitar divulgação por acidente. Assim sendo, a SGS adquire e mantém os dados dos clientes na medida do necessário para o funcionamento eficaz do seu negócio ou

para cumprir com os requisitos legais. Por este motivo, nenhum colaborador/estagiário da SGS deve procurar o acesso a dados pessoais ou confidencias a não ser para uma finalidade comercial legítima.

4 Metodologia

As análises laboratoriais deste trabalho foram realizadas no Laboratório de Microbiologia da empresa SGS. Foi desenvolvido o Método Horizontal de Detecção de *Escherichia coli* O157:H7, de acordo com ISO 16654-2001, em paralelo com os métodos atualmente em uso na empresa, PCR e VIDAS® UP *E. coli* O157 (including H7) (ECPT), sendo a carne picada escolhida como matriz para o presente estudo.

4.1 Obtenção das amostras

As amostras para estudo foram recebidas durante o período de estágio na empresa, cujo pedido de análise microbiológica incluía a pesquisa de *E. coli* O157:H7, sendo posteriormente selecionadas ao acaso para o desenvolvimento deste trabalho. No entanto, como nesse período não foram detetadas amostras positivas para o dito microrganismo e, como o principal objetivo remete à validação do método, por decisão da empresa contaminaram-se três das amostras com uma estirpe de referência pertencente ao laboratório.

Como dito anteriormente, para a implementação de métodos numa empresa é necessário o estudo de pelo menos 10 amostras para a validação. Como tal, para este estudo foram adquiridas 15 mostras de carne.

4.2 Método Horizontal de Detecção de *E. coli* O157:H7

Este método possui quatro etapas: pré-enriquecimento; separação e concentração, enumeração e confirmação. No entanto, foram adotadas novas alterações no método por opção do laboratório.

Para o pré-enriquecimento das amostras foram pesados 25,0 g de carne para um saco de Stomacher e homogeneizados em 225 mL com caldo de triptona de soja modificada (mTSB) (composição g/L: peptona tríptica de caseína: 17,0; peptona de soja: 3,0; D (+) - glucose: 2,5; sais bilares nº 3: 1,5; cloreto de sódio: 5,0; hidrogenofosfato dipotássico: 4,0), à qual foi adicionada novobiocina (composição g/L: novobiocina: 0,45) sob agitação contínua num agitador de Stomacher durante 30 segundos (Laboratory Blender, Stomacher 400), seguindo-se a incubação em estufa (Memmert) a $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Após o período de incubação as amostras foram inoculadas com uma ansa descartável nos meios seletivos CT-SMAC (Cefixima telurito sorbitol MacConkey agar) (composição g/L: peptona tríptica de caseína: 17,9; peptona péptica de carne: 3,0; sorbitol: 10,0; sais bilares nº 3: 1,5; cloreto de

sódio: 5,0; vermelho neutro: 0,03; violeta cristal: 0,001; agar: 9 a 18), e no meio chrom ID O157:H7 (composição g/L: peptona de gelatina (bovina ou porcina): 5,5; extrato de levedura: 6,0; cloreto de sódio: 5,0; carbonato de sódio: 0,13; vermelho neutro 0,01; desoxicolato de sódio (bovino ou ovino): 1,5; mistura de hidratos de carbono (bovino): 24; mistura de ativadores: 0,25; mistura cromogénica: 0,25; agar:12,5) o qual foi suplementado com mistura cefixima-telurito (CT-M) (composição mg/L: cefixima: 0,05; telurito de potássio: 2,5), sendo posteriormente incubadas 24 horas a 37°C. Depois desse período procedeu-se à confirmação das colónias formadas, sendo que no caso de não apresentarem a cor característica o seu resultado foi classificado como negativo. No caso de o resultado ser positivo, isto é, no caso de surgirem colónias características, 5 dessas colónias foram inoculadas numa placa com TSA (composição g/L: triptona: 15,0; cloreto de sódio: 5,0; peptona de soja: 5,0; agar: 15,0) para a obtenção de colónias puras, incubando-se posteriormente 24 horas a 37°C. Após esse período procederam-se aos testes confirmativos, nomeadamente, testes bioquímicos e testes serológicos. Para os testes bioquímicos inoculou-se uma colónia pura do nutriente agar para um tubo contendo triptofano (composição g/L: triptona: 10,0; cloreto de sódio: 5,0; DL- triptofano: 1,0), seguindo-se incubação 24 horas a 37°C. Posteriormente confirmou-se a presença de *E. coli* O157:H7 adicionando-se 1 mL de reagente de Kovac's (composição: 4-dimetilaminobenzaldeído: 5,0 g/L; penta-1-ol: 75,0 mL; ácido clorídrico: 25,0 mL). Para o teste serológico foi utilizado um anti-soro específico para *E. coli* O157:H7. Colocou-se em três lâminas uma gota de solução salina (0,85% NaCl) à qual foi adicionada com uma ansa descartável uma colónia pura de cada amostra, de modo a obter uma suspensão homogénea, para averiguação da auto-aglutinação (formação de aglomerados). Como não ocorreu auto-aglutinação procedeu-se então à adição do anti-soro (BD Difco® *E. coli* H Antiserum H7) para *E. coli* O157.

Durante este procedimento uma das alterações feitas diz respeito à separação imunomagnética, a qual não foi efetuada por opção da empresa, como referido anteriormente, tendo sido proposto como alternativa, no caso de surgirem colónias que se mostrassem inconclusivas e que suscitassem qualquer dúvida quanto à sua positividade nos meios seletivos, a realização de uma suspensão das mesmas em BPW para a deteção/confirmação utilizando diretamente a técnica de PCR. No presente estudo não foi necessário esse procedimento uma vez que os resultados se mantiveram em concordância em todos os testes realizados, como será explicado mais detalhadamente adiante.

Na Figura 4.1 encontra-se representado o método utilizado e as alterações efetuadas.

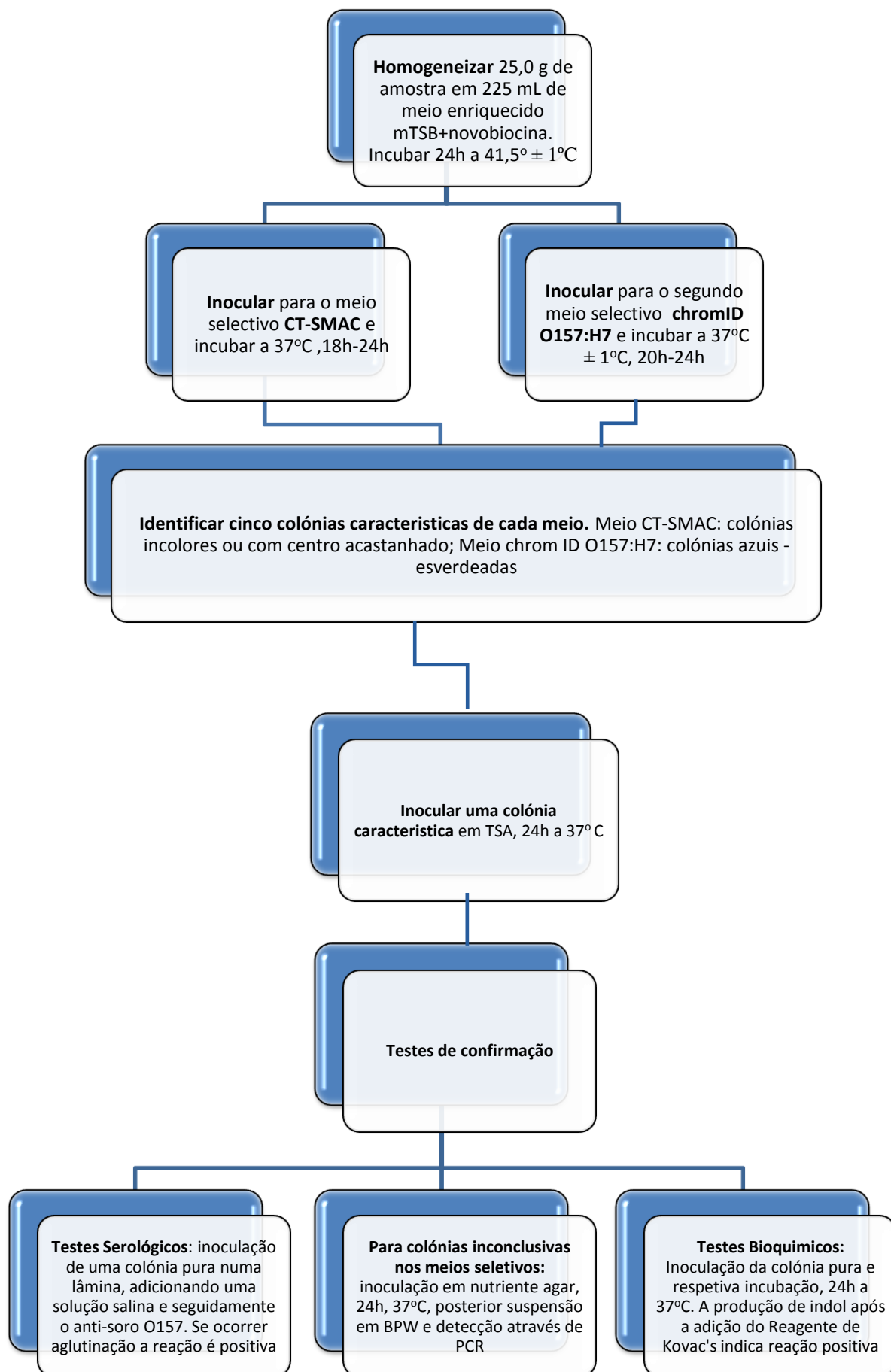


Figura 4.1 - Método Horizontal de Detecção de *E. coli* O157:H7 com as alterações efetuadas.

4.3 Método de PCR (método atualmente em uso pela empresa)

Paralelamente ao procedimento tradicional acima descrito foi efetuada a detecção de *E. coli* O157:H7 pelo método de PCR (iQ-Check® *E. coli* O157:H7 - BioRad).

Inicialmente foram pesados 10,0 g de amostra numa balança analítica (AES Laboratoire) para um saco de stomacher, ao qual foi posteriormente adicionado BPW até perfazer 100 mL (composição g/L: peptona péptica de carne: 10,0; cloreto de sódio: 5,0; hidrogenofosfato dissódico dodecahidratado ($\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$): 9,0; hidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4): 1,5 g), seguindo para incubação em estufa (Mettler) a $41,5^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, 8 horas.

Após o período de incubação retiraram-se 100 μL do reagente de lise para eppendorfs ao qual se adicionaram 100 μL de amostra, agitando no vortex (BR-2000 vortexer) durante 1 minuto. Os eppendorfs foram, após agitação, colocados numa placa de aquecimento (Multi-Block Heater) entre 95°C a 100°C durante 15 minutos. Seguidamente procedeu-se à preparação do mix PCR (avaliando o número de amostras, juntamente com os controlos, consultou-se o anexo do referido kit de forma a constatar quanto desta solução se teve de preparar. (Consultar anexo 1). Seguidamente foram distribuídos 45 μL da solução de amplificação na microplaca de PCR (Individual PCR tubes), sendo posteriormente transferidos 5 μL do sobrenadante, preparado inicialmente, utilizando uma micropipeta. Foram igualmente transferidos 5 μL de sobrenadante para os poços que continham os controlos positivo e negativo. As microplacas foram seladas com tampas (Flat Cap Strips) seguindo-se posteriormente a colocação das mesmas no aparelho de PCR (Bio-Rad DNA Engine®) (Figura 4.2) e o decorrer do processo de amplificação após a preparação do software (intervalo de detecção 515-730 nm).

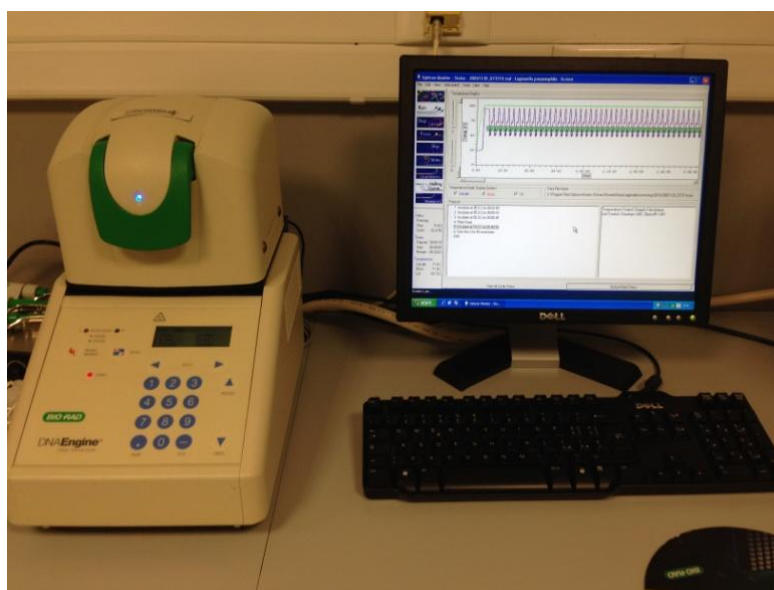


Figura 4.2 - Aparelho de PCR, Bio-Rad DNA Engine®

4.4 Método VIDAS® UP *E. coli* O157 (including H7) (ECPT) (atualmente em uso pela empresa)

O VIDAS® ECPT é um teste baseado no método ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) automatizado nos aparelhos da família VIDAS®. O cone (SPR®) (Figura 4.3) de utilização única serve tanto de fase sólida como de suporte de pipetagem. O interior do cone está coberto com uma proteína recombinante de fago que permite a captura de *E. coli* O157 incluindo H7. Os restantes reagentes necessários à reação imunológica encontram-se repartidos na “barrete” (Figura 4.3). Se o microrganismo alvo estiver presente na amostra, ocorrerá reação antigénio-anticorpo, e posteriormente, pela adição de um conjugado (anticorpo ligado a fosfatase alcalina), bem como de um substrato contendo o fluorocromo 4-Metil-umbeliferil fosfato, que permitirá a emissão de fluorescência, sendo esta medida pelo sistema VIDAS a 450 nm (Figura 4.4). Terminado o teste, os resultados são analisados automaticamente pelo aparelho, tal como já referido, que fornece um valor de teste (Vt) para cada amostra. Este valor é comparado com referências internas (limiares) e cada resultado é interpretado (positivo ou negativo).

Todas as etapas do teste são efetuadas automaticamente no aparelho. São constituídas por uma sucessão de ciclos de aspiração e dispensação no meio reacional. Os elementos que ficam livres são eliminados por lavagem. Este teste foi realizado em simultâneo com os métodos descritos anteriormente. As condições de preparação das amostras foram idênticas às de PCR. Após o período de incubação foram colocados 5 mL de cada amostra em tubos esterilizados, sendo posteriormente aquecidas numa placa de aquecimento (Multi-Block Heater) durante 5 minutos. Depois do aquecimento das amostras deixou-se arrefecer as mesmas transferindo-se posteriormente 0,5 mL para o poço da barrete. Foram igualmente colocados nos poços 0,5 mL de controlo positivo, controlo negativo e um calibrador. Aquando da abertura de um novo “kit” mini-VIDAS (BioMerieux®) (Figura 4.3) deve introduzir-se o respetivo código de barras. As barretes foram colocadas no aparelho MINI VIDAS® (Vitek Systems, MINI VIDAS Biomerieux®), assim como os cones (SPR®). Procedeu-se à identificação das amostras no aparelho dando-se assim início à análise.



Figura 4.3 - Barrete e cone mini-VIDAS.



Figura 4.4 – Aparelho mini-VIDAS.

5 Resultados e Discussão

Neste trabalho foram avaliadas 15 amostras de carne para a detecção de *E. coli* O157:H7 de acordo com os três métodos descritos.

Para a verificação da conformidade dos resultados entre os três métodos, estes foram efetuados em simultâneo.

5.1 Resultado PCR

Segundo a tabela 5.1, respeitante ao método de PCR pode constatar-se que das 15 amostras analisadas apenas as 3 contaminadas deram de facto resultado positivo para *E. coli* O157:H7, tal como esperado.

Tabela 5.1 – Resultados da Análise de PCR

Identificação das Amostras	Descrição das Amostras	Data da Análise	Ct	Resultado
Amostra 1	Carne Picada	24-02-2014	37,48	Negativo
Amostra 2	Carne Picada	24-02-2014	37,24	Negativo
Amostra 3	Carne Picada	24-02-2014	34,60	Negativo
Amostra 4	Salsicha fresca	24-02-2014	34,14	Negativo
Amostra 5	Salsicha fresca	24-02-2014	34,32	Negativo
Amostra 6	Carne Picada	24-02-2014	33,91	Negativo
Amostra 7	Carne Picada	24-02-2014	33,31	Negativo
Amostra 8	Carne Picada	24-02-2014	34,58	Negativo
Amostra 9	Almôndegas	24-02-2014	35,11	Negativo
Amostra 10	Carne Picada	24-02-2014	34,71	Negativo
Amostra 11	Carne Picada	24-02-2014	33,78	Negativo
Amostra 12	Carne Picada	24-02-2014	17,14	Positivo
Amostra 13	Carne Picada	24-02-2014	16,50	Positivo
Amostra 14	Carne Picada	24-02-2014	16,26	Positivo
Amostra 15	Almôndegas	24-02-2014	33,20	Negativo

Nesta técnica, para que um resultado seja considerado positivo para a presença de *E. coli* O157:H7 é necessário que o valor de Ct (cycle threshold), isto é, o limiar de cada ciclo, seja igual ou superior a 10. Se o valor de Ct for igual ou superior a 28 o resultado é considerado negativo. Como se pode verificar na tabela 5.1 apenas as amostras 12, 13 e 14 apresentaram valores de Ct superiores a 10 e inferiores a 28, o que indicou a positividade do resultado, as restantes amostras tendo o valor de Ct superior a 28 foram consideradas negativas. Esses valores são calculados com base na comparação dos valores Ct das amostras com um controlo. Para que o cálculo de Ct seja válido, a eficiência da amplificação da amostra alvo e da referência endógena deve ser aproximadamente igual (Oliveira, 2010). Os controlos, um positivo e outro

negativo, de acordo com o método estipulado devem ter os resultados apresentados na tabela 5.2, caso contrário, o procedimento deve ser repetido.

Tabela 5.2 – Valores dos Controlos

	Controlo
Controlo Negativo	n.d ¹
Controlo Positivo	Entre 26 e 36

1- n.d – não determinado

Neste trabalho os valores dos controlos estiveram de acordo com os parâmetros estabelecidos, o que permitiu a validação positiva dos resultados das amostras.

A tecnologia de PCR em tempo real, que foi utilizada neste trabalho, possui primers e sequências de DNA específicas para *E. coli* O157:H7, assim como nucleótidos e DNA polimerase. A deteção e análise de dados são otimizados usando a nova tecnologia de PCR (Bio-Rad®), neste caso o sistema Chromo4®.

Durante a reação de PCR, vários ciclos de aquecimento e arrefecimento permitem a desnaturação do DNA, por calor, seguindo-se a ligação pelos primers na região alvo. A DNA polimerase, em seguida, utiliza esses primers e trifosfatos de desoxinucleótidos (dNTPs) para alongar a cadeia de DNA, para a formação de cópias do DNA alvo. Estas cópias são chamadas de fragmentos amplificados.

Nesta técnica sondas específicas são utilizadas para detetar o DNA durante a amplificação por hibridação com o fragmento amplificado. Estas sondas são ligadas a um fluorocromo, que emite fluorescência apenas quando hibridado com a sequência alvo. No kit iQ-Check® *E. coli* O157: H7, existe então um fluorocromo ligado à sonda de hibridação para a sequência específica de DNA da *E. coli* O157:H7. Na ausência de DNA alvo, nenhuma fluorescência é detetada e a amostra é considerada negativa. Como a quantidade de produtos de amplificação aumenta com cada ciclo de amplificação, a intensidade de fluorescência também aumenta, sendo assim a amostra considerada positiva. Durante cada ciclo de PCR, na etapa de hibridação, o sistema mede a intensidade de fluorescência em função do número de ciclos. É um método que permite de uma maneira simples determinar a presença de *E. coli* O157:H7 numa amostra. Para monitorizar uma amplificação bem-sucedida de DNA em cada tubo de reação, um controlo interno de DNA sintético está incluído no *mix* de reação. Este controlo é amplificado com uma sonda específica, ao mesmo tempo que a sequência de DNA alvo de *E. coli* O157:H7, e detetado por um segundo fluorocromo.

Esta técnica tem vindo ao longo dos anos a ser aprimorada não só a nível de instrumentação, a qual tem sido concebida com maior fiabilidade, como também ao nível de

uma melhoria nos protocolos o que tem feito com que a tecnologia de PCR em tempo real seja a tecnologia de referência para a detecção de DNA. A simplicidade, especificidade, elevada sensibilidade no que se refere à utilização de uma sonda ou de um corante apropriado, rapidez, redução do risco de contaminação pós- amplificação, elevado potencial de produção, introdução contínua de novos químicos, detecção de quantidades relativamente pequenas de DNA alvo e a facilidade de quantificação fazem desta técnica uma técnica extremamente vantajosa para a detecção de DNA específico de um determinado microrganismo que se pretende detetar. Em contrapartida a sua utilização requer uma elevada competência profissional e assistência técnica muito especializada e finalmente é uma tecnologia com um custo inicial muito elevado devido ao preço do equipamento, o que impede que muitos laboratórios estejam equipados com esta tecnologia (Oliveira, 2010).

Comparativamente ao método de PCR em tempo real na PCR convencional a técnica tem a capacidade de amplificar uma sequência precisa de DNA aliada à sua simplicidade, rigor, elevada sensibilidade, especificidade e versatilidade. Desta forma, não é necessário isolar o DNA que se pretende amplificar (mesmo que este se encontre misturado com o DNA de outras espécies), uma vez que a especificidade da PCR é dada pelos primers. É uma técnica rápida, barata, segura e não requer muito espaço em laboratório. No entanto, apesar das inúmeras vantagens que potencia, apresenta algumas limitações, tais como, a necessidade de conhecer antecipadamente a sequência de DNA a amplificar, para que possam ser sintetizados primers específicos. Outras desvantagens prendem-se com o facto da grande facilidade com que ocorre a contaminação da amostra por DNA estranho (uma vez que se trata de uma técnica muito sensível) (Oliveira, 2010).

5.2 Resultado VIDAS® UP *E. coli* O157 (including H7) (ECPT)

No que diz respeito ao método de VIDAS® UP *E. coli* O157 (including H7) (ECPT) os resultados encontram-se descritos na tabela 5.3.

Tabela 5.3 – Resultado VIDAS® UP *E. coli* O157

Identificação das Amostras	Descrição das Amostras	Data da Análise	VT*	Resultado
Amostra 1	Carne Picada	24-02-2014	0,01	Negativo
Amostra 2	Carne Picada	24-02-2014	0,00	Negativo
Amostra 3	Carne Picada	24-02-2014	0,00	Negativo
Amostra 4	Salsicha fresca	24-02-2014	0,00	Negativo
Amostra 5	Salsicha fresca	24-02-2014	0,02	Negativo
Amostra 6	Carne Picada	24-02-2014	0,00	Negativo
Amostra 7	Carne Picada	24-02-2014	0,00	Negativo
Amostra 8	Carne Picada	24-02-2014	0,00	Negativo
Amostra 9	Almôndegas	24-02-2014	0,00	Negativo
Amostra 10	Carne Picada	24-02-2014	0,01	Negativo
Amostra 11	Carne Picada	24-02-2014	0,00	Negativo
Amostra 12	Carne Picada	24-02-2014	2,07	Positivo
Amostra 13	Carne Picada	24-02-2014	2,01	Positivo
Amostra 14	Carne Picada	24-02-2014	2,00	Positivo
Amostra 15	Almôndegas	24-02-2014	0,00	Negativo

Como se pode constatar, tal como na PCR, apenas as amostras contaminadas foram positivas, nomeadamente as amostras 12, 13 e 14, o que desta forma permite visualizar a concordância dos resultados existente entre estes dois métodos.

Os resultados analisados automaticamente pelo aparelho, tal como já referido, fornecem um valor de teste (Vt) para cada amostra. Este valor é comparado com referências internas (limiares) e cada resultado é interpretado como sendo positivo ou negativo. O aparelho efetua duas medidas de fluorescência na cuvete de leitura para cada teste. A primeira leitura corresponde ao branco da cuvete antes do substrato entrar em contato com o cone. A segunda leitura é efetuada após incubação do substrato com a enzima presente no cone. Na folha de resultados impressa pelo aparelho surge o valor de teste e o valor de *Relative Fluorescence Value* (RFV). O cálculo do RFV é o resultado da diferença das duas medidas. Este valor obtido para cada amostra é interpretado pelo aparelho da seguinte forma:

$$\text{Valor do Teste} = \text{RFV amostra} \div \text{RFV calibrador}$$

Na tabela 5.4 podem observar-se os valores de referência interna que são utilizados para a classificação das amostras.

Tabela 5.4 – Valor de Referência do Teste VIDAS

Valor do Teste	Interpretação
<0,04	Negativo
$\geq 0,04$	Positivo

Deste modo, pode observar-se que os valores de teste obtidos para as amostras positivas foram muito superiores aos limites de teste ($\geq 0,04$), sendo 2,07; 2,01 e 2,00, respetivamente.

Este é um teste que oferece uma especificidade e sensibilidade únicas. Com poucas horas de execução, o VIDAS® UP *E. coli* O157 (incluindo o H7) é o teste mais rápido do mercado para a deteção deste agente patogénico. No entanto, apesar de ser um teste de rápida execução e de rápida aquisição de resultados apresenta algumas limitações. Podem ser observadas reações com estirpes que possuem recetores de superfície comuns com a *E. coli* O157 incluindo H7, tais como *Salmonella* do grupo N.

5.3 Resultado Método Horizontal

No método horizontal para a deteção da estirpe em questão pôde constatar-se que houve a formação de colónias características em ambos os meios seletivos nas três amostras contaminadas artificialmente, amostra 12, 13 e 14, respetivamente.

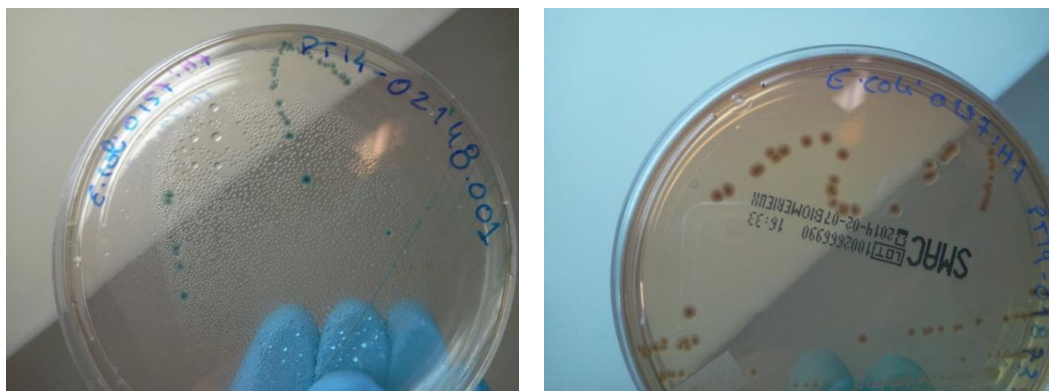


Figura 5.1 - Colónias características nos meios seletivos. À esquerda, meio chromID O157 e à direita meio CT-SMAC.

Na tabela 5.5 são apresentados os resultados referentes às amostras. Como se pode verificar, nos meios seletivos em que não houve contaminação das amostras, as colónias formadas apresentaram cor rosa escuro no meio CT-SMAC e colónias roxas com halo de cor azul no meio chrom ID O157:H7, logo o resultado foi considerado negativo (Figura 5.2). Em contrapartida, as amostras com cor azul-esverdeadas no meio chrom ID e incolores mas com centro amarelo-acastanhado no meio CT-SMAC permitiram classificar o resultado destas como positivo.

Tabela 5.5 – Resultado do Método Horizontal de Detecção de *E. coli* O157:H7.

Detecção	Meio de Cultura	Identificação das Amostras	Data da Análise	Coloração das colónias desenvolvidas	Testes de Confirmação		Resultado
					Produção de Indol	Aglutinação com anti-soro <i>E. coli</i> O157	
<i>E. coli</i> O157:H7	Gelose chrom ID O157:H7	Amostras 12, 13, 14	24-02-2014	Azul-esverdeado	+	+	Positivo
	CT-SMAC	Amostras 12, 13, 14	24-02-2014	Acastanhadas	+	+	Positivo
Outras estirpes	Gelose chrom ID O157:H7	Amostras 1-11; 15	24-02-2014	Roxas com halo azul	---	---	Negativo
	CT-SMAC	Amostras 1-11; 15	24-02-2014	Rosa escuro	---	---	Negativo

O crescimento dos microrganismos nos diferentes meios de cultura utilizados fornece as primeiras informações para a sua identificação. Deste modo, é importante garantir que os meios utilizados possuem determinados elementos, tais como a sua composição nutricional, que permitem o desenvolvimento do microrganismo que se pretende detetar. A inclusão de vários substratos cromogénicos no meio de cultura facilita a diferenciação de culturas microbianas. Os meios cromogénicos revolucionaram os testes microbiológicos por garantir a identificação presumtiva do microrganismo de acordo com a coloração que este apresenta no meio semeado. As colónias são facilmente identificadas através da coloração diferenciada. Isso aumenta a eficiência dos testes e poupa tempo e custos comparados aos procedimentos tradicionais (Perry e Freydière, 2007).

Na execução do método horizontal foram utilizados os meios CT-SMAC e gelose chrom ID O157:H7 tal como referido ao longo deste trabalho. No caso do meio CT-SMAC, a presença de sorbitol e de telurito permite a diferenciação de *E. coli* O157:H7 caracterizando-se pela presença de colónias incolores com centro amarelo-acastanhado. As outras *E. coli* que

fermentam o sorbitol dão origem a colónias rosas a vermelhas, tal como pode ser visualizado na figura 5.2. A seletividade deste meio em relação a bactérias Gram-positivo e a algumas *Enterobacteriaceae* é assegurada pelo cefixima, sais biliares, pelo cristal violeta e telurito, tal como já foi mencionado neste trabalho (<http://www.biomerieux.pt>; Lima, 2012).

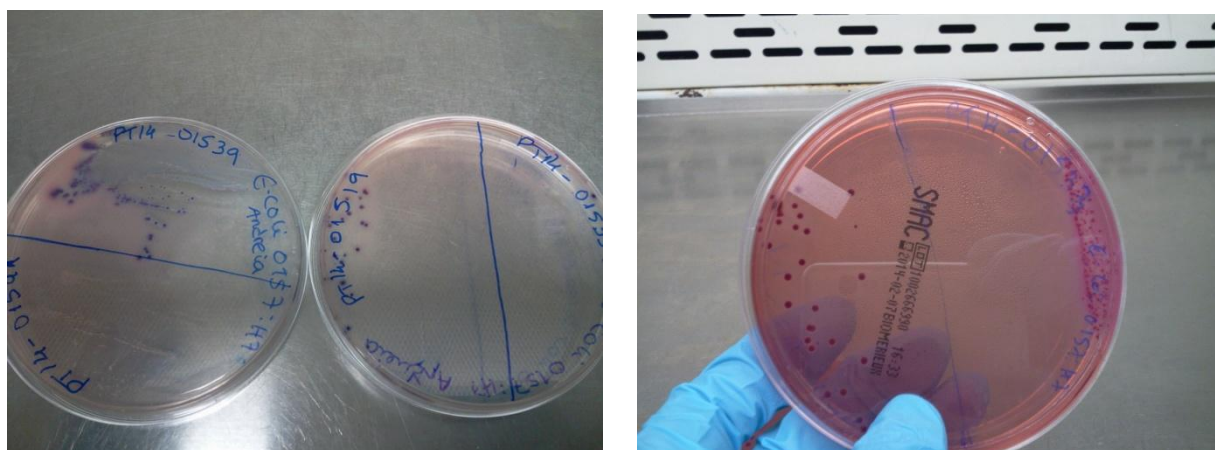


Figura 5.2 – Colónias não características formadas nos meios seletivos. À esquerda meio chromID O157 e à direita meio CT-SMAC.

A gelose chrom ID O157:H7 permite a pesquisa e a identificação presuntiva de *Escherichia coli* enterohemorrágicas, nomeadamente, *E. coli* O157:H7. Esta gelose contém uma mistura de glúcidos e dois substratos cromogénicos para a deteção de duas atividades enzimáticas: 1- a β -D-galactosidase presente em todas as estirpes de *Escherichia coli* seja qual for o seu serotipo; 2- a β -D-glucuronidase específica para todas as estirpes de *Escherichia coli* não O157:H7. A seletividade em relação a bactérias Gram positivas é fornecida através do desoxicolato de sódio. Para aumentar a sua seletividade em relação às enterobactérias, ao meio chrom ID O157:H7 foi adicionada uma mistura de cefixima-telurito (CT). Trata-se de um reagente complementar utilizado para suplementar tanto a gelose chrom ID O157:H7 como o meio MacConkey Sorbitol Agar (CT-SMAC). A adição de CT permite obter uma melhor seletividade em relação às enterobactérias e facilitar a deteção, numa flora abundante, de *Escherichia coli* enterohemorrágicas, devido a uma melhor inibição de outros microrganismos Gram negativos (Bennet et al., 1995; Zadik et al., 1993). Além de permitir a inibição de bactérias Gram positivas inibe igualmente fungos filamentosos. Este meio permite assim a identificação de *E. coli* O157:H7 após apenas 18-24 horas de incubação a 37°C, desenvolvendo as colónias, como se pode observar na figura 5.1 cor azul-esverdeado.

Apesar destes métodos possuírem características que permitem o desenvolvimento do microrganismo específico que se pretende avaliar, é um método moroso, devido aos períodos de incubação, além disso podem surgir falsos positivos.

Após os resultados acima indicados, nomeadamente, os respeitantes às colónias características detetadas, procedeu-se aos testes de confirmação das mesmas. Para a realização desses testes efetuou-se o teste bioquímico da produção de indol através da utilização do aminoácido triptofano e um teste serológico com um anti-soro para *E. coli* O157:H7.

No teste bioquímico pôde verificar-se a formação de um anel vermelho na superfície dos tubos que continham a amostra depois de adicionado o reagente Kovac's, o que leva a concluir que houve formação de indol através do triptofano, como pode ser observado na figura 5.3.

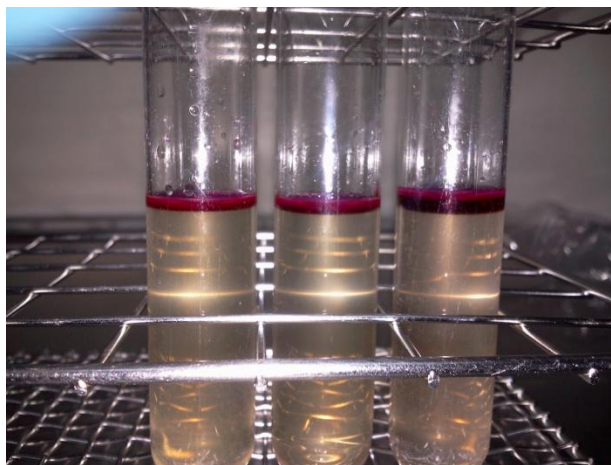


Figura 5.3 – Formação de indol após a adição do reagente de Kovac's.

Paralelamente ao teste bioquímico realizado efetuou-se, então, o teste serológico com anti-soro (BD Difco® *E. coli* H Antiserum H7) específico para o serotipo O157. Procedeu-se à adição de uma gota de cloreto de sódio (0,85%) nas colónias a serem estudadas, de forma a averiguar se ocorria auto-aglutinação. Como essa reação não ocorreu procedeu-se então à análise com o referido anti-soro. Após a adição deste verificou-se que ocorreu aglutinação, como se pode observar na figura 5.4, o que permite considerar o resultado desta análise como positivo para *E. coli* O157:H7.

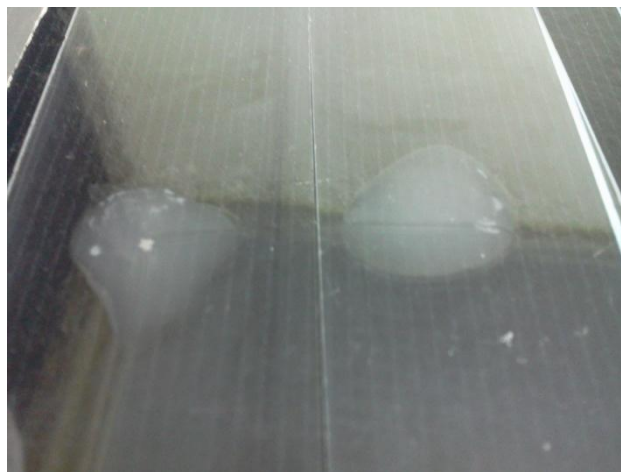


Figura 5.4 – Teste de aglutinação com anti-soro.

Como foi dito ao longo do trabalho, para a implementação de métodos é necessária a realização de análises de rotina laboratorial utilizando o novo método em paralelo, com a norma de referência correspondente. Assim, tal como objetivado inicialmente, pretendia-se verificar a concordância de resultados entre os dois métodos já em uso na empresa e o método horizontal de detecção de *E. coli* O157:H7, a fim deste último ser validado e implementado na empresa. Deste modo, após a análise dos resultados obtidos nos três métodos pôde observa-se que estes se encontram em concordância, tendo sido detetadas as 3 amostras contaminadas, mantendo-se as restantes também em conformidade de resultados.

Apesar do método a implementar ter sofrido ligeiras alterações, nomeadamente a não execução da separação imunomagnética, pôde constatar-se que os resultados obtidos nos meios seletivos e na posterior realização dos testes confirmativos mantiveram-se sempre em concordância com os resultados dos restantes métodos. Sendo, assim foi demonstrado de que apesar da separação imunomagnética ser um passo que permite uma melhor seletividade de *E. coli* O157:H7, de acordo com a literatura consultada, não é no entanto um passo fulcral para a detecção do microrganismo, visto que os resultados se apresentaram em consonância, como se pode verificar na tabela 5.6. Além disso, como também mencionado na metodologia deste trabalho, a separação imunomagnética é um procedimento que não será executado nos laboratórios da SGS e, por esse motivo no caso em que possam em posteriores análises surgir resultados que suscitem dúvidas nos resultados das colónias formadas, estas deverão ser suspensas numa solução contendo água peptonada tamponada (BPW) sendo em seguida diretamente analisadas por PCR. Isto porque dos três métodos, a PCR, é o mais sensível visto que atua especificamente com o DNA da bactéria. Conforme, os dados da tabela 5.6 e as regras para a implementação de métodos quando referentes a pesquisas de microrganismos, pode então afirmar-se que este método foi validado podendo ser implementado na empresa.

Tabela 5.6 – Resultados dos três métodos executados

Método	Nº de amostras analisadas	Amostras Negativas	Amostras Positivas
Método Horizontal	15	12	3
PCR	15	12	3
VIDAS UP <i>E. coli</i> O157:H7	15	12	3

A pesquisa de *E. coli* O157:H7 na empresa é recente, tendo sido esta iniciada em 2012. Segundo os registos consultados das análises efetuadas desde 2012 até 2013, num total de 1262 amostras registaram-se apenas 23 amostras positivas para o microrganismo em estudo. Dentro destas 23 amostras, o que corresponde a 1,82%, 4 foram positivas em 25,0 g e 19 foram positivas em 10,0 g, o que corresponde a 1,51% e 0,32%, respetivamente.

Entre as amostras positivas em 10,0 g é de salientar que 18 dessas amostras corresponderam a preparados de carne picada, sendo que apenas 1 amostra correspondeu a uma matriz diferente, nomeadamente carpaccio de novilho. Por sua vez, em 25,0 g de alimento as matrizes correspondentes nessa análise foram 2 amostras de carcaças, 1 amostra de toucinho e 1 amostra de masséter de bovino.

Na tabela 5.7 podem constatar-se as amostras acima referidas, assim como as datas em que foram detetadas.

Tabela 5.7 – Amostras positivas em 10,0 g no período de 2012-2013.

Amostras positivas em 10,0 g	Data da Análise
Amostra 1 - Preparado de carne picada	20.03.12
Amostra 2- Preparado de carne picada	08.06.12
Amostra 3 - Preparado de carne picada	24.04.12
Amostra 4 - Preparado de carne picada	24.04.12
Amostra 5 - Preparado de carne picada	29.06.12
Amostra 6 - Carpaccio de novilho	29.06.12
Amostra 7 - Preparado de carne picada	26.09.12
Amostra 8 - Preparado de carne picada	19.07.12
Amostra 9 - Preparado de carne picada	28.11.12
Amostra 10 - Preparado de carne picada	12.03.13
Amostra 11 - Preparado de carne picada	31.01.13
Amostra 12 - Preparado de carne picada	31.01.13
Amostra 13 - Preparado de carne picada	26.02.13
Amostra 14 - Preparado de carne picada	26.02.13
Amostra 15 - Preparado de carne picada	05.03.13
Amostra 16 - Preparado de carne picada	05.03.13
Amostra 17 - Preparado de carne picada	07.03.13
Amostra 18 - Preparado de carne picada	14.03.13
Amostra 19 - Preparado de carne picada	27.06.13

Na tabela 5.8 pode verificar-se as análises e referidas datas para 25,0 g de amostra.

Tabela 5.8 – Amostras positivas em 25,0 g no período de 2012-2013.

Amostras Positivas em 25 g	Data da Análise
Amostra 1 – Carcaça	08.03.12
Amostra 2 – Carcaça	08.03.13
Amostra 3 – Toucinho	31.08.12
Toucinho 4 - Masséter de novilho	06.09.13

Como se pode constatar, foram detetadas amostras positivas entre os meses de Março a Setembro, sendo o mês de Março aquele em que se obteve um maior número de amostras positivas.

Como referido neste trabalho existem vários fatores que podem contribuir para o crescimento e desenvolvimento deste microrganismo. Um desses fatores mencionados diz respeito ao comportamento sazonal ligado à ecologia da *E. coli* O157:H7. Os países tropicais, por exemplo, possuem condições climáticas que favorecem a proliferação de bactérias contaminantes, facto este refletido na alta prevalência de doenças diarreicas, assim como a elevada incidência de *E. coli* O157:H7 a qual deverá ser maior nos trópicos do que em regiões temperadas (Arias et al., 2001). Embora esta afirmação se possa enquadrar na análise dos dados das tabelas 5.7 e 5.8, pois como se pode verificar existem mais amostras contaminadas nos períodos quentes do ano, não se pode no entanto correlacionar estes valores com a maioria dos casos especificados na literatura referentes a este padrão ecológico de desenvolvimento do microrganismo, visto que se tratam maioritariamente de dados provenientes de surtos e não de análises alimentares. Além disso, em Portugal não existem estudos efetuados sobre este agente patogénico e a correlação entre o seu desenvolvimento durante a variação sazonal. Outro facto que pode eventualmente relacionar-se com a escassez de informação em Portugal pode dever-se à notificação obrigatória de doenças transmitidas por microrganismos, o que no caso de *E. coli* O157:H7 pode verificar-se analisando a tabela 5.9, que este microrganismo não consta dessa mesma lista, o que pode levar a que outros microrganismos, também eles causadores de outras patologias, acabem por ser considerados os principais responsáveis pelas doenças de origem alimentar, podendo não traduzir a situação real.

Uma doença de declaração obrigatória é aquela para a qual informação frequente, regular e temporalmente adequada relativamente aos casos de doença individuais é considerada necessária para a sua prevenção e controlo, para isso existe um sistema de Vigilância de Doenças de Declaração Obrigatória que é um sistema de vigilância de saúde pública multifacetado destinado a fornecer às autoridades de saúde locais, regionais e nacionais a capacidade de monitorizar a ocorrência e disseminação de doenças transmissíveis, fornecendo a

base para o planeamento e intervenção na sua prevenção e controlo. A notificação da doença, a nível local, protege a saúde da população assegurando a identificação e seguimento dos casos, identificação de contactos, investigação e contenção de surtos de doença e limitar o risco ambiental (Pinto et al., 2013).

Tabela 5.9 – Doenças de notificação obrigatória em Portugal. Adaptado da Portaria nº 1071/98 de 31 de Dezembro

Doenças de notificação obrigatória em Portugal	
Cólera Febres tifóide e paratifoide Outras salmoneloses Shigelose Botulismo Tuberculose respiratória Tuberculose do sistema nervoso Tuberculose miliar Peste Carbúnculo Brucelose Leptospirose Doença de Hansen (lepra) Tétano neonatal Tétano Difteria Tosse convulsa Raiva Meningite meningocócica Febre-amarela	Doença dos legionários Sífilis congénita Sífilis precoce Infecções gonocócicas Doença de Lyme Febre escaro-nodular Febre Q Poliomielite aguda Hepatite aguda A Hepatite aguda B Hepatite aguda C Hepatite viral não especificada Parotidite epidémica Malária Leishmaníase visceral Equinocose Triquiníase Meningite por <i>Haemophilus influenza</i> Rubéola congénita Sarampo
Rubéola (exclui rubéola congénita) Outras hepatites virais agudas (exclui a hepatite C) Infecção meningocócica (exclui meningite meningocócica) Doença de Creutzfeldt Jakob (encefalopatia Espongiforme subaguda) Infecção por <i>Haemophilus influenza</i> (exclui meningite por <i>Haemophilus influenza</i>)	

Em Portugal devido à escassez de informação relativamente às doenças de origem alimentar, tal como referido anteriormente, pode traduzir-se numa incorreta avaliação da verdadeira situação, o que pode levar igualmente a uma incorreta perceção da importância relativa de cada uma das doenças. Para esta situação contribuem diversos fatores. A maioria das vítimas de uma infeção ou intoxicação alimentar não recorre a um profissional de saúde e, quando o faz, raramente é sujeita a análises que permitem identificar o agente responsável (Veiga et al., 2009). De acordo com Veiga e colaboradores a inexistência de bases de dados centralizadas com os resultados das análises a alimentos efetuadas por laboratórios oficiais (e, eventualmente, de laboratórios não oficiais) dificulta a perceção da real dimensão deste problema e de quais os principais agentes envolvidos. Dada a escassez dos dados disponíveis, é

difícil estabelecer uma tendência da evolução da incidência de doenças de origem alimentar e da ocorrência dos principais contaminantes dos alimentos nos últimos anos em Portugal (Veiga et al., 2009).

Segundo os mesmos autores desde 2005 que a declaração de surtos de origem alimentar se tornou obrigatória para todos os Estados Membros, não existindo no entanto harmonização da investigação dos sistemas de declaração nos Estados Membros, o que significa que os valores relatados podem não refletir os níveis de segurança relativos entre Estados Membros (Veiga et al., 2009). Aliado a este facto podem associar-se as técnicas laboratoriais de deteção deste microrganismo, sendo que os métodos utilizados e a sensibilidade dos mesmos são variáveis de laboratório para laboratório e entre os países da União Europeia (EFSA, 2013).

Em Portugal os dados referentes a surtos provocados por *E. coli* enterohemorrágicas são fornecidos pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge para o período entre 2002 e 2012. No entanto, os casos reportados nesse estudo não expressam a presença específica de *E. coli* O157:H7 como uma das estirpes envolvidas nos casos mencionados. Durante esse período foram estudadas 1038 estirpes de *E. coli*, nomeadamente os principais fatores de patogenicidade, onde se incluíram toxinas termolábeis e termoestáveis, verotoxinas e intimina, de doentes portugueses de várias regiões do país. Segundo esses registos, a estirpe detetada com maior frequência foi ETEC (36,6%), seguindo-se EAEC (26,7%) e VTEC (25,3%). Com menor frequência encontra-se EPEC (8,5%) e ETEC/VTEC (2,9%), como se pode verificar na figura 5.5 (Silveira et al., 2013).

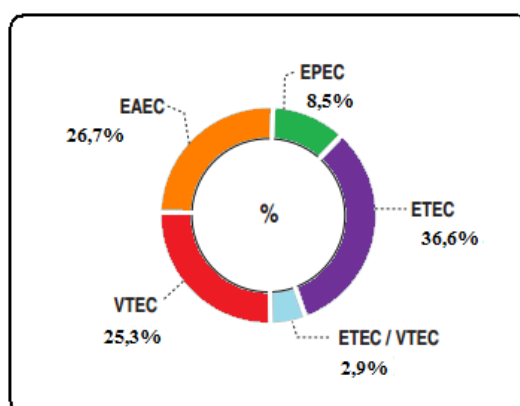


Figura 5.5 – Percentagem total das várias estirpes de *E. coli* detetadas.
Adaptado a partir de Silveira et al. 2013.

Na figura 5.6 pode observar-se o número de casos confirmados para as diferentes estirpes, no período de 2002-2012. Observando o gráfico pode constatar-se que entre 2002 e 2003 *E. coli* EAEC (enteroagregativa) foi o patotipo mais comum, seguindo-se VTEC e ETEC. Em 2004 registou-se um aumento de casos de infeções por VTEC e ETEC, havendo uma diminuição de infeções por EAEC ao contrário do que acontecia nos dois anos anteriores. Como se pode

verificar a partir desta data *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) foi a estirpe com maior número de casos reportados, exceto para o ano de 2007. A partir de 2009 denota-se uma acentuada diminuição de casos, notando-se um ligeiro aumento em 2012 (Silveira et al., 2013).

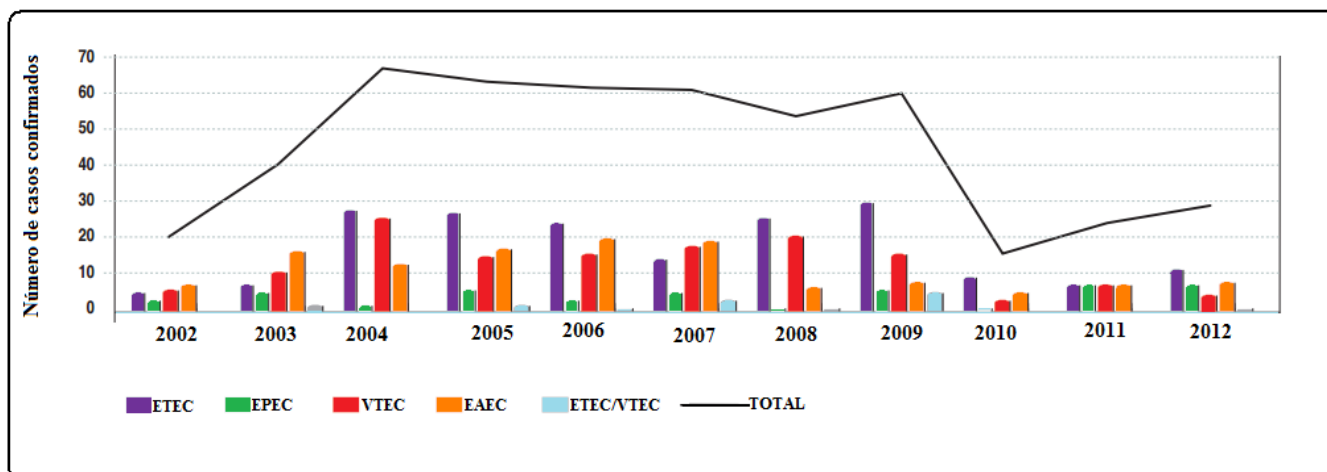


Figura 5.6 – Número de casos confirmados das várias estirpes de *E. coli*, durante o período compreendido entre 2002 e 2012. Adaptado de Silveira et al., 2013

Escherichia coli é conhecida pela sua versatilidade ecológica (Jacobsen et al., 2009). A sua capacidade de sobreviver nos alimentos, água e solo tem implicações importantes para a sua persistência em animais, nomeadamente no gado bovino, e também na contaminação de culturas recorrentes do abastecimento com água contaminada (Bach et al., 2002). A dose infetante deste microrganismo é muito baixa, o que aumenta o risco de desenvolvimento de doenças. Este facto pode ser associado com a elevada frequência de valores obtidos para o número de doenças provocadas por VTEC em Portugal (Silveira et al., 2013).

Segundo a Organização Mundial da Saúde uma doença de origem alimentar é qualquer doença de natureza infecciosa ou tóxica causada pelo consumo de alimentos (WHO, 2008). No entanto, além do consumo de alimentos se encontrar entre as principais causas de intoxicações alimentares, a falta de qualidade da água tem sido reconhecida como a maior causa internacional de mortalidade e prejuízo económico.

As infeções de origem alimentar têm sido a maior causa de doenças humanas durante séculos, apesar de se manterem subnotificadas e a sua verdadeira incidência desconhecida. Estas infeções adquiriram dimensão internacional devido não só à globalização como às alterações climáticas, tecnológicas, de hábitos sociais, demográficas e económicas (Viegas, 2009). Assim, torna-se importante a comunicação destes casos, não só para determinar qual ou quais os microrganismos causadores dessas infeções alimentares como também a sua origem. Aliado a este facto, conhecendo-se a etiologia dos microrganismos causadores destas doenças pode

recorrer-se a um melhoramento dos sistemas de segurança implementados na produção alimentar e aos programas de educação para a saúde; pode minimizar-se o impacto humano, económico e social destas doenças e ainda melhorar a confiança do consumidor, a sustentabilidade da cadeia alimentar e segurança dos géneros alimentícios, bem como diminuir o peso destas doenças nos serviços de saúde (Viegas et al., 2013).

Viegas e colaboradores desenvolveram um estudo de modo a analisar e interpretar dados de investigação epidemiológica de base laboratorial de surtos de intoxicações alimentares realizadas no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge em 2013. De acordo com os autores entre 2009 e 2013 ocorreram cerca de 40 surtos onde se conseguiu determinar qual o agente etiológico em causa, sendo *Staphylococcus* spp. o microrganismo maioritariamente identificado nesse período (42%), seguindo-se *Clostridium botulinum* (17%), *Salmonella* spp. (12%), *Clostridium perfringens* (13%), *E. coli* VTEC (8%). Os locais onde ocorreu a exposição do alimento implicado nesses mesmos surtos foram maioritariamente casas particulares (32%), cantinas (23%), seguindo-se instituições, restaurantes e locais desconhecidos (12%), entre 2009 e 2012. Já em 2013 as cantinas foram o local onde ocorreram maiores exposições ao alimento envolvido nos surtos (35%), seguindo-se as casas particulares e locais desconhecidos (20%). Em 10 surtos ocorridos em 2013 registaram-se 183 casos humanos e 17 hospitalizações, tendo sido o agente etiológico identificado. A enterotoxina estafilocócica foi o agente etiológico identificado em 5 surtos, tendo-se observado também 1 surto de cada um dos agentes *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* verotoxigénica (VTEC) não O157, e toxina botulínica (Viegas et al., 2013). Os géneros alimentares envolvidos nesses surtos foram maioritariamente refeições mistas (50%) e produtos de pastelaria (20%) para o ano 2013, notando-se também um maior envolvimento desses géneros alimentares para o período de 2009 a 2012 (Viegas et al., 2013). Entre 2009 e 2013 foram registados os internamentos de episódios agudos e doenças infecciosas e intestinais (17482 internamentos). Infeções provocadas por Enterovirus/Adenovirus, toxoplasmose, listeriose foram algumas das doenças diagnosticadas. No entanto, destacam-se os episódios de infeções intestinais mal definidas com elevados números de casos de internamentos, como se pode observar na tabela 5.10, realçando-se uma vez mais, a falta de informação quanto aos microrganismos causadores destas patologias.

Tabela 5.10 – Internamentos de episódios agudos e doenças infecciosas intestinais.
Adaptado de Viegas et al. 2013

	2009	2010	2011	2012	2013
Infeções intestinais mal definidas	2394	1967	2446	2609	1458

Melhorar a vigilância epidemiológica e laboratorial devendo esta ser obrigatória quando há doentes internados. Nestes casos a caracterização molecular das estirpes isoladas é um passo importante para a identificação de surtos dispersos e determinar fontes de contaminação na cadeia de produção alimentar (Viegas et al., 2013).

A deteção de VTEC depende muito dos métodos aplicados, variando estes entre os diferentes países da União Europeia, como já referido.

Em 2006, 22 países membros reportaram casos de infeções causadas por VTEC. O total de casos reportados foi de 4916 dos quais 99,8% foram confirmados em laboratórios representando um aumento de 1694 casos desde 2005 (EFSA, 2007).

Em 2010 um total de 4 000 casos de infeções causadas por VTEC em humanos foram notificados em 25 Estados Membros na União Europeia. Também nesse ano, quase metade dos serogrupos “O” relatados correspondeu ao serogrupo O157 (41,1%). O mesmo aconteceu em 2011, O157 (41,2%), seguido por O104 (20,1%). Durante 2007-2010 o serotipo mais comumente relatado foi O157:H7 (774 de 2140 casos), seguido por O157:H- (273 casos) e O103: H2 (131 casos). Em 2011, o serotipo mais comumente relatado foi O104: H4, seguido por O157: H- (117 casos) e O157: H7 (114 casos). Para o mesmo período, 2007-2010, e tendo em conta diferentes faixas etárias, em 584 casos de SUH o serogrupo era conhecido e 64,2% desses casos foram registados em crianças até 4 anos de idade e 26,0% na faixa etária dos 5-14 anos. Destes grupos, VTEC O157 foi identificada em 65,7% dos casos, seguido por VTEC O26 em 18,6% dos casos (EFSA, 2013).

No que diz respeito ao registo de análises alimentares para a deteção de estirpes patogénicas na União Europeia, as mesmas encontram-se na figura 5.7. As análises que se encontram em baixo representadas foram efetuadas em amostras alimentares de 16 países membros e um país não membro entre o ano de 2005 e 2006 para a deteção de amostras positivas para VTEC.

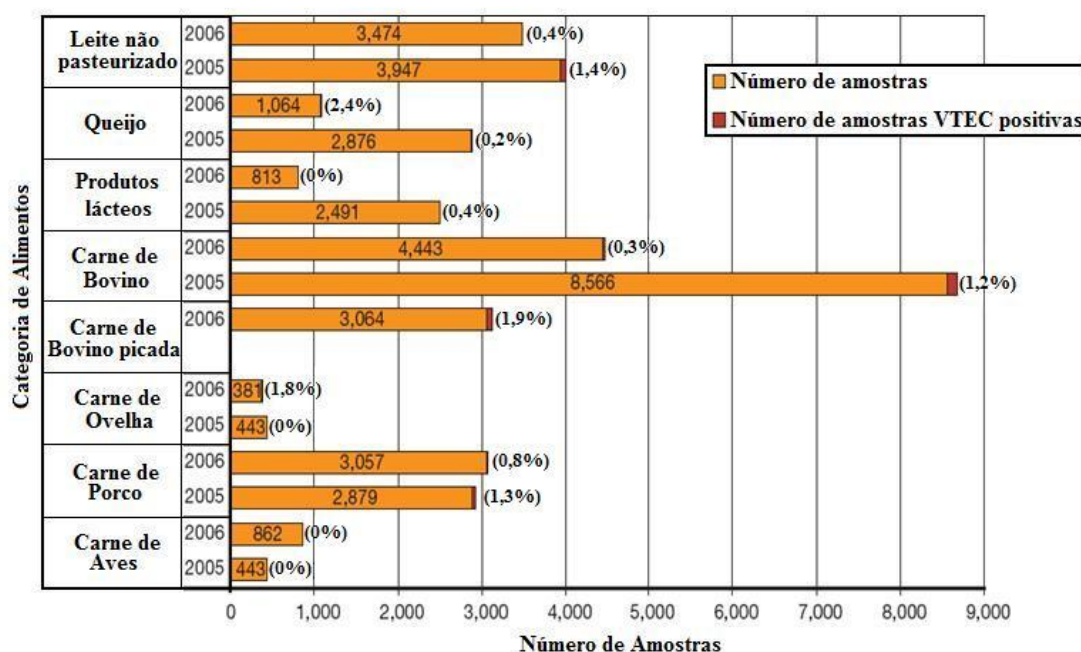


Figura 5.7 – Número de amostras de alimentos no período de 2005-2006. Adaptado de EFSA 2007.

Como se pode verificar analisando a referida figura os produtos como o leite de vaca cru, queijo, carne de bovino, carne de bovino picada e carne de porco são os alimentos onde se constata haver mais amostras positivas. No entanto, deve notabilizar-se que os dados a partir de diferentes investigações não são diretamente comparáveis. Existem diferenças nas estratégias de amostragem e métodos de análise aplicados nos países envolvidos na notificação destas análises (EFSA, 2007).

No mesmo relatório para Portugal, surgem análises efetuadas em animais tais como suínos, caprinos e ovinos, tendo-se registado no gado suíno as maiores proporções de amostras positivas de VTEC (158 amostras positivas). A Alemanha reportou investigações incluindo amostras de suínos onde VTEC foi detetada em 2,4% dos animais. Em treze isolados desta estirpe a partir de estudos portugueses e alemães foram identificados os serogrupos envolvidos. Três casos isolados foram identificados como O157, sendo os demais identificados como O138, O139 ou O141, os quais estão associados com a doença do edema em leitões.

Assim, constata-se que o serogrupo patogénico mais importante para humanos, reportado pelos Estados Membros em várias categorias de alimentos, incluindo carne bovina, leite de vaca, queijos, carne de porco e carne de carneiro e também em suínos, ovinos e coelhos foi o serogrupo VTEC O157 (EFSA, 2007).

6 Conclusão

Existem muitas razões para que doenças transmitidas por alimentos sejam um constante desafio para a saúde pública. Embora algumas doenças possam ser controladas, outras novas acabam por surgir. O número de casos descritos em crianças, idosos, indivíduos imunodeprimidos ou que de outra forma se mostrem suscetíveis a doenças transmitidas por alimentos tem vindo a aumentar em muitos países. A globalização de mercados levou à distribuição internacional rápida e generalizada dos alimentos, o que por sua vez conduziu a que microrganismos patogénicos possam ser inadvertidamente introduzidos em novas áreas geográficas (WHO, 2008).

As infeções causadas por *E. coli* enterohemorrágicas são doenças importantes que têm emergido nas últimas décadas, não tanto pelo número de casos associados às doenças mas pela gravidade com que os sintomas destas se manifestam nos humanos. O serogrupo O157 e o serotipo O157:H7, em particular, têm causado uma série de infeções humanas, através do consumo de alimentos de origem animal, principalmente em alimentos provenientes do gado bovino, como por exemplo, a carne picada (Çadircı et al., 2010).

Desde o seu reconhecimento como um patogénico de origem alimentar, têm sido registados inúmeros surtos de infeções de origem alimentar devido a *E. coli* O157:H7, tornando-se assim essencial um correto diagnóstico para a identificação deste microrganismo. Para isso ao longo do tempo novas técnicas laboratoriais têm sido desenvolvidas de forma a melhorar a eficácia, o tempo de execução e de interpretação dos resultados.

Neste trabalho pretendeu-se efetuar a validação e implementação do método horizontal de deteção de *E. coli* O157:H7 comparando os resultados do mesmo com os métodos em uso na empresa. Para tal, foram contaminadas artificialmente três amostras de carne para o presente estudo, que como se pôde observar, foram detetadas nos três métodos. Deste modo, os resultados dos três métodos mantiveram-se sempre concordantes o que permite que o novo método a implementar seja validado.

Em Portugal existe escassez de informação relativamente às doenças de origem alimentar. Essa falta de informação pode traduzir-se numa incorreta avaliação da verdadeira situação, levando a uma incorreta perceção da importância relativa de cada doença de origem alimentar.

Como se verificou, embora as técnicas utilizadas para a deteção e enumeração de *E. coli* O157:H7 variem nas diferentes regiões geográficas, muitos dos países europeus possuem registos relacionados com o microrganismo em estudo, não acontecendo o mesmo em Portugal. Portanto, sendo *E. coli* O157:H7 um microrganismo de grande importância devido à severidade dos danos causados no organismo e, não existindo dados concretos quanto a infeções

provocadas por este em Portugal, assim como informação disponível quanto à sua presença em alimentos, torna-se importante a realização de estudos para um levantamento de dados em que se possa indicar a verdadeira incidência deste patogénico no país.

7 Referências Bibliográficas

Ali, J., Pappa, E. (2011) Understanding structural changes in global meat sector: a comparative analysis across geographical regions. 21st Annual IFAMA World Forum and Symposium on the Road to 2050: Sustainability as a Business Opportunity, 1-10.

Ali, S.H. (2004) A socio-ecological autopsy of the *E. coli* O157:H7 outbreak in Walkerton, Ontario, Canada. *Social Science & Medicine* 58: 2601–2612.

Arias, M.L., Monge-Rojas, R., Chaves, C., Florencia Antillón, F. (2001) Effect of storage temperatures on growth and survival of *Escherichia coli* O157: H7 inoculated in foods from a neotropical environment. *Revista de Biología Tropical* 49(2): 517-524.

Bach, S.J., McAllister, T.A., Veira, D.M., Gannon, V.P.J., R. A. Holley, R.A. (2002) Transmission and control of *Escherichia coli* O157:H7 — A review. *Canadian Journal of Animal Science*, 82(4): 475-490.

Bastos, P.A.M.B. (2009) Sobrevivência de *Escherichia coli* O157:H7 em iogurtes. Tese Pós-graduação em Medicina Veterinária - Universidade Federal Fluminense.

Batista, P., Noronha, J., Oliveira, J., Saraiva, J. (2003) Modelos Genéricos de HACCP. Forvisão – Consultoria em Formação Integrada, 1-15.

Bauer, M.E., Welch, R.A. (1996) Characterization of an RTX toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infection and Immunity*, 64(1): 167-175.

Bennett, A.R., MacPhee, S., Betts, R.P. (1995) Evaluation of methods for the isolation and detection of *Escherichia coli* O157 in minced beef. *Letters in Applied Microbiology*, 20: 375-379.

Benjamin, M.M., Datta, A.R. (1995) Acid tolerance of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4): 1669–1672.

Bertão, A.M.S., Halha Ostrensky Saridakis, H.O. (2007) *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (STEC): principais fatores de virulência e dados epidemiológicos. Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, 28(2): 81-92.

Blanco, J.E., Blanco, M., Alonso, M.P., Mora, A., Dahbi, G., Coira, M.A., J. Blanco, J. (2004) Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga Toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999. Journal of Clinical Microbiology, 42(1): 311–319.

Boerlin, P., McEwen, S.A., Boerlin-Petzold, F., Wilson, J.B., Johnson, R.P., Carlton L. Gyles, C.L.(1999) Associations between virulence factors of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and disease in humans. Journal of Clinical Microbiology, 37(3):497-503.

Buchanan, R.L., Doyle, M.P. (1997) Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other Enterohemorrhagic *E. coli*. Food Technology, 51(10): 69-76.

Burland. V., Shao, Y., Perna, N.T., Plunkett, G., Heidi J. Sofia, H.J., Blattner, F.R. (1998) The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. Nucleic Acids Research, 26(18): 4196–4204.

Çadırcı, Ö., Sırken, B., Inat, G., Kevenk, T.O. (2010) The prevalence of *Escherichia coli* O157 and O157:H7 in ground beef and raw meatball by immunomagnetic separation and the detection of virulence genes using multiplex PCR. Meat Science, 84: 553–556.

Chart, H., Jenkins, C., Smith, H.R., Hedges, D., Bernard Rowe, B. (1998) Haemolysin production by strains of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. Microbiology, 144: 103-107.

Chung, H.J., Bang, W., Drake, M.A. (2006) Stress Response of *Escherichia coli*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 5: 52-64.

Clavero, M.R., Beuchat, L.R. (1996) Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in broth and processed salami as influenced by pH, water activity, and temperature and suitability of media for its recovery. Applied and Environmental Microbiology, 62 (8): 2735– 2740.

Corrêa, F.A.F. (2012) Características dos patótipos de *E. coli* e implicações de *E. coli* patogênica para aves em achados de abatedouros frigoríficos. Tese Mestrado em Ciência Animal - Universidade Federal de Goiás.

Creydt, V.P., Miyakawa, M.F., Martín, F., Zotta, E.,C. Silberstein, C., Ibarra, C. (2004) The Shiga toxin 2 B subunit inhibits net fluid absorption in human colon and elicits fluid accumulation in rat colon loops. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37(6): 799-808.

Currie, A., Macdonald, J., Ellis, A., Siushansian, J., Chui, L., Charlebois, M., Peermohamed, M., Everett, D., Fehr, M., NG, Lai-King. (2007) Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infections Associated with Consumption of Beef Donair. *Journal of Food Protection*, 70(6): 1483–1488.

Decreto de Lei nº 147/2006 — 31 de Julho de 2006- DIÁRIO DA REPÚBLICA — I SÉRIE- nº146. Ministérios da Economia, da Agricultura, e desenvolvimento rural e pescas.

Deisingh, A.K., Thompson, M. (2004) Strategies for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in foods. *Journal of Applied Microbiology*, 96: 419–429.

Doyle, M.E., Archer, J., Kaspar, C.W., Ronald Weiss, R. (2006) Human illness caused by *E. coli* O157:H7 from food and non-food sources. *Food Research Institute Briefings*, 1-37 (Disponível em http://fri.wisc.edu/docs/pdf/FRIBrief_EcoliO157H7humanillness.pdf, consultado em 25/01/14).

Duffy, G., Cummins, E., Nally, P., O' Brien, S., Butler, F. (2006) A review of quantitative microbial risk assessment in the management of *Escherichia coli* O157:H7 on beef. *Meat Science*, 74: 76–88.

Duffy, G., Garvey, P., Sheridan, J. J. (2002). A European study on animal food & biomedical aspects of *E. coli* O157: H7. Teagasc, ISBN 1 84170 278, 1: 1-16.

EFSA (2007) The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2006. *The EFSA Journal*, 130: 2-352.

EFSA (2013) Scientific Opinion on VTEC- seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment. EFSA Journal, 11(4):3138.

Eierhoff, T., Stechmann, B., Römer, W. (2012) Pathogen and toxin entry-how pathogens and toxins induce and harness endocytotic mechanisms. Molecular Regulation of Endocytosis, 10: 249-275.

Endo, Y., Tsurugi, K., Yutsudo, T., Takeda, Y., Ogasawara, T., Igarashi, K. (1988) Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157: H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes RNA N-glycosidase activity of the toxins. European Journal of Biochemistry, 171 (1-2): 45 – 50.

Estatísticas Agrícolas (2012). Instituto Nacional de Estatística. (Disponível em <http://www.agroportal.pt/x/agronoticias/2013/07/19b.htm>, consultado em 13/11/13)

Etcheverría, A.I., Padola, N.L., Sanz, M.E., Polifroni, R., Krüger, A., Passucci, J., Rodríguez, E.M., Taraborelli, A.L., Ballerio, M., Parma, A.E. (2010) Occurrence of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) on carcasses and retail beef cuts in the marketing chain of beef in Argentina. Meat Science, 86: 418–421.

Evolução da balança de pagamentos do sector das carnes (2010). Observatório dos Mercados Agrícolas e das Importações Agro-Alimentares. (Disponível em http://www.agroportal.pt/x/agronoticias/2011/02/28a_BalancaCarne_De2010_Final_2.pdf, consultado em 13/11/13)

FAO/WHO Food Standards (2003) CODEX ALIMENTARIUS, Versão Portuguesa CAC/RCP 1-1969 Rev. 4, 1-56.
(Disponível em www.codexalimentarius.net, consultado em 17/11/13)

FAO/WHO Food Standards (2003) Risk profile for Enterohemorrhagic *E. coli* including the identification of the commodities of concern, including sprouts, ground beef and pork. Codex Alimentarius.

Franco, R.M., Mantilla, S.P.S., Leite, A.M.O.3, (2008) Enumeração de *Escherichia coli* em carne bovina e de aves através de metodologia miniaturizada utilizando-se "eppendorf" e caldo fluorogênico. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias 103: 201-207.

Frankel, G., Phillips, A.D., Rosenshine, I., Dougan, G., Kaper, J.B., Stuart Knutton, S. (1998) Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Molecular Microbiology*, 30(5): 911– 921.

Fraser, M.E., Fujinaga, M., Cherney, M.M., Melton-Celsa, A.R., Twiddy, E.M., D. O'Brien, A.D., James, M.N.G. (2004) Structure of Shiga Toxin Type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Biological Chemistry*, 279(26): 27511–27517.

FSAI (Food Safety Authority of Ireland) (1999) The prevention of *E. coli* O157:H7 infection – A shared responsibility.

(Disponível em <http://www.lenus.ie/hse/bitstream/10147/44797/1/6358.pdf>, Consultado em 14/02/14)

Garcia, P.M., Arcuri, E.F., Brito, M.A.V.P., Lange, C.C., Brito, J.R.F., Cerqueira, M.M.O.P. (2008) Detecção de *Escherichia coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de leite cru por método convencional e PCR multiplex. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 60 (5): 1241-1249.

Gansheroff, L.J., O'Brien, A.D. (2000) *Escherichia coli* O157:H7 in beef cattle presented for slaughter in the U.S.: Higher prevalence rates than previously estimated. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(7): 2959 –2961.

Gruenheid, S., Sekirov, I., Thomas, N.A., Deng, W., O'Donnell, P., Goode, D., Li, Y., Frey, E.A., Brown, N.F., Metalnikov, P., Pawson, T., Ashman, K., Finlay, B.B. (2004) Identification and characterization of NleA, a non-LEE encoded type III translocated virulence factor of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Molecular Microbiology*, 51(5):1233–1249.

Herlax, V., Henning, M.F., Bernasconi, A.M., Goñi, F.M., Bakás, L. (2010) The lytic mechanism of *Escherichia coli* α -hemolysin associated to outer membrane vesicles Lytic action mechanism of OMVs-associated HlyA. *Health*, 2(5): 484-492.

Hermos, C.R., Janineh, M., Han, L.L., McAdam, A.J. (2011) Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Children: Diagnosis and Clinical Manifestations of O157:H7 and Non-O157:H7 Infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(3): 955–959.

Hugas, M., Garriga, M., Monfort, J.M. (2002) New mild technologies in meat processing: high pressure as a model Technology. *Meat Science* 62: 359–371.

Hupková, D., Bielík, P., Turcekova, N. (2009) Structural changes in the beef meat demand in Slovakia and demand elasticity estimation. *Agricultural Economics*, 55(8): 361–367.

Hurley, B.P., Jacewicz, M., Thorpe, C.M., Lincicome, L.L., King, A.J., Keusch, G.T., Acheson, D.W.K. (1999) Shiga Toxins 1 and 2 translocate differently across polarized intestinal epithelial cells. *Infection and Immunity*, 67(12): 6670–6677.

Ikeda, K., Ida, O., Kimoto, K., Takatorige, T., Nakanishi, N., Tatara, K. (2000) Predictors for the development of haemolytic uraemic syndrome with *Escherichia coli* O157:H7 infections: with focus on the day of illness. *Epidemiology & Infections*, 124: 343-349.

INFOSAN (International Food Safety Authorities Network) (2007). *Escherichia coli* O157:H7 outbreak in spinach. INFOSAN Information Note, nº 1, 1-5.

Jacobsen, L., Durso, L., Conway, T., Nickerson, K.W. (2009) *Escherichia coli* O157:H7 and other *E. coli* strains share physiological properties associated with intestinal colonization. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(13): 4633–4635.

Johnson, T.J., Nolan, L.K. (2009) Pathogenomics of the Virulence Plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(4): 750–774.

Kaplan, B.S., Meyers, K.E., Schulman, S.L. (1998) The Pathogenesis and Treatment of Hemolytic Uremic Syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology*, 9(6): 1126-1133.

Kim, J.Y., Kim, S.H., Kwon, N.H., Bae, W.K., Lim, J.Y., Koo, H.C., Kim, J.M., Noh, K.M., Jung, W.K., Park, K.T., Park, Y.H. (2005) Isolation and identification of *Escherichia coli* O157:H7 using different detection methods and molecular determination by multiplex PCR and RAPD. *Journal of Veterinary Science*, 6(1): 7–19.

Law, D. (2000) Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin- producing *E. coli*. *Journal of Applied Microbiology*, 88 (5): 729-745.

Lima, A.L. (2012) Prevalência de *E. coli* O157:H7 e linhagens produtoras de toxina tipo Shiga em carcaças de frango de corte abatidas no estado de Minas Gerais. Dissertação de Mestrado em Ciência Animal - Universidade Federal de Minas Gerais.

Lim, J.Y., La, H.J., Sheng, H., Forney, L.J., Hovde, C.J. (2010) Influence of Plasmid pO157 on *Escherichia coli* O157:H7 sakai biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(3): 963-966.

Lim, J.Y., Yoon, J.W., Hovde, C.J. (2010) A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its Plasmid O157. *Journal of Microbiology Biotechnology*, 20(1): 5–14.

Lin, J., Smith, M.P., Chapin, K.C., Baik, H.S., Bennett, G.N., Foster, J.W. (1996) Mechanisms of acid resistance in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(9): 3094-3100

Lowe, R.M.S., Baines, D., Selinger, L.B., Thomas, J.E., McAllister, T.A., Sharma, R. (2009) *Escherichia coli* O157:H7 strain origin, lineage, and Shiga Toxin 2 expression affect colonization of cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(15): 5074–5081.

Manning, S.D., Motiwala, A.S., Springman, A.C., Qi, W., Lacher, D.W., Ouellette, L.M., Mladonicky, J.M., Somsel, P., Rudrik, J.T., Dietrich, S.E., Zhang, W., Swaminathan, B., Alland, D., Whittam, T.S. (2008). Variation in virulence among clades of *Escherichia coli* O157:H7 associated with disease outbreaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(12): 4868– 4873.

March, S.B., Ratnam, S. (1986) Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 23(5): 869-872.

Marejková, M., Blahová, K., Janda, J., Fruth, A., Petrás, P. (2013) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* as Causes of Hemolytic Uremic Syndrome in the Czech Republic. *Journal Plos One*, 8(9): 1-10.

Marzocca, M.A., Marucci, P.L., Sica, M.G., Álvarez, E.E. (2006) Detección de *Escherichia coli* O157:H7 en carne picada fresca y hamburguesas congeladas. *Revista Argentina de Microbiología*, 38: 38-40.

Mead, P.S., lutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., Tauxe, R.V. (1999) Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 5(5): 607-625.

Mermin, J.H., Griffin, P.M. (1999) Invited Commentary: Public Health in Crisis: Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 Infections in Japan. American Journal of Epidemiology, 150(8): 797-803.

Michel, P., Wilson, J.B., Martin, S.W., R. C. Clarke, R.C., McEwen, S.A., Gyles, C.L. (2004) Temporal and geographical distributions of reported cases of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Ontario. Epidemiology and Infection, 122: 193-200.

Michino, H., Araki, K., Minami, S., Takaya, S., Sakai, N., Miyazaki, M., Ono, A., Yanagawa, H. (1999) Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in school children in sakai city, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. American Journal of Epidemiology, 150(8): 787-796.

Microbial Risk Assessement Guideline (2012) Pathogenic microorganisms with focus on food and water. Food Safety and Inspection Service, 1:1-207.

Mittelstaedt, S., Carvalho, V.M. (2006) *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) O157H7 – Revisão. Revista do Instituto de Ciências da Saúde 24(3): 175-182.

Neil, P.K., Biggerstaff, G., MacDonald, J.M., Trees, E., Medus, C., Musser, K.A., Stroika, S.G., Zink, D., Sotir, M.J. (2012) A novel vehicle for transmission of *Escherichia coli* O157:H7 to humans: multistate outbreak of *E. coli* O157:H7 infections associated with consumption of ready-to-bake commercial prepackaged cookie dough—United States, 2009. Clinical Infectious Diseases, 54(4): 511-518.

Oliveira, C.S.V. (2012) Detecção de *Escherishia coli* O157:H7 em leite armazenado em diferentes condições por PCR. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária - Universidade Federal Fluminense.

Oliveira, T.M.S. (2010) PCR em tempo real: métodos e aplicações. Dissertação de Mestrado em Toxicologia e Ecotoxicologia - Universidade de Aveiro.

Ortega, A.C., Borges, M.S. (2012) Codex Alimentarius: a segurança alimentar sob a ótica da qualidade. Segurança Alimentar e Nutricional, 19(1): 71-81.

Ostroff, S.M., Kobayashi, J.M., Lewis, J.H. (1989) Infections with *Escherichia coli* O157:H7 in Washington State - The First Year of Statewide Disease Surveillance. The Journal of Medical Association, 262(3): 355-359.

Pacheco, A.R., Sperandio, V. (2012) Shiga toxin in enterohemorrhagic *E. coli*: regulation and novel anti-virulence strategies. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2(81): 1-12.

Paradela, A.M.B.M. (2008) Disseminação de genes de resistência em estirpes clínicas de *Escherichia coli*. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Molecular- Universidade de Aveiro.

Pennington, H. (2010) *Escherichia coli* O157- Review. The Lancet, 376: 1428–35.

Pennington, H. (2009) The Public Inquiry into the September 2005 Outbreak of *E. coli* O157 in South Wales. (Disponível em <http://wales.gov.uk/ecoliinquiry/?lang=en>, consultado em 16/01/14)

Perna, N.T., Mayhew, G.F., Pósfai, G., Elliott, S., Sonnenberg, M.S., Kaper, J.B., Blattner, F.R. (1998) Molecular evolution of a pathogenicity island from Enterohemorrhagic O157:H7 *Escherichia coli*. Infection and Immunity, 66(8): 3810-3817.

Perry, J.D., Freydière, A.M. (2007) The application of chromogenic media in clinical microbiology. Journal of Applied Microbiology, 103: 2046– 2055.

Pessegueiro, P., Pires, C. (2005) Síndrome hemolítico urémico / Púrpura trombocitopénica trombótica. Revista da Sociedade Portuguesa de Medicina Interna, 1(2): 102-116.

Pigatto, C. P. (2004) Isolamento e frequência de *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (STEG) em cultura fecal de bovinos no estado do Paraná – Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Paraná.

Pinto, C.S., Valente Rosa, M.V., Nascimento, M.L.P.R., Bordalo, A. (2013) Doenças de Declaração Obrigatória. Direção Geral da Saúde, 1:1-67.

Price, S.B., Wright, J.C., DeGraves, F.J., Castanie-Cornet, M.P., Foster, J.W. (2004) Acid resistance systems required for survival of *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine gastrointestinal tract and in apple cider are different. *Microbiology Applied and Environmental Microbiology*, 70(8): 4792–4799.

Portaria nº 1071/98 de 31 de Dezembro aprova a tabela das doenças de declaração obrigatória, ordenada de acordo com o código da 10.a Revisão da Classificação Internacional de Doenças (CID), e utilizando a respetiva nomenclatura nosológica, conforme a Deliberação nº 131/97, de 27 de Julho.

Raftari, M., Jalilian, F.A., Abdulmir, A.S., Son, R., Sekawi, Z., Fatimah, A.B. (2009) Effect of organic acids on *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* contaminated meat. *The Open Microbiology Journal*, 3: 121-127.

Rahal, E.A., Kazzi, N., Nassar, F.J., Matar, G.M. (2012) *Escherichia coli* O157:H7—Clinical aspects and novel treatment approaches. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2 (138): 1-7.

Rangel, J.M., Sparling, P.H., Crowe, C., Griffin, P.M., David L. Swerdlow, D.L. (2005) Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982–2002. *Journal Emerging Infectious Diseases*, 11(4): 603-609.

Rashid, R.A., Tabata, T.A., Oatley, M.J., Besser, T.E., Tarr, P.I., Moseley, S.L. (2006) Expression of putative virulence factors of *Escherichia coli* O157:H7 differs in bovine and human infections. *Infection and Immunity*, 74(7): 4142–4148.

Reilly, A. (1998) Prevention and control of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections: Memorandum from a WHO meeting. *Bulletin of the World Health Organization*, 76 (3): 245-255.

Ribeiro, M.G., Costa, E.O., Leite, D.S., Langoni, H., Júnior, F.G., Victória, C., Listoni, F.J.P. (2006) Fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina. *Arquivo Brasileiro de medicina veterinária e zootécnica*, 58 (5): 724-731.

Rivas, M., Leotta, G., Chinen, I. (2008) Diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* O157 productor de toxina Shiga a partir de alimentos. *WHO Global Salm Surv: Manual de Procedimientos “Detección de STEC O157 en alimentos”*, 1-152.

Rowe, P.C. (1995) *Escherichia coli* O157:H7, other verotoxin-producing *E. coli* and the hemolytic uremic syndrome in childhood. The Canadian Journal of Infectious diseases: Consensus Statement, 6(2): 105-110.

Saad, S.M.I. (1997) - Comportamento de *Escherichia coli* Enterohemorrágica O157:H7 frente a bactérias autóctones em carne bovina moída - Tese Doutorado em Ciência dos Alimentos. Universidade de São Paulo.

Sant'ana, A.S., Franco, B.D.G.M. (2009) Avaliação quantitativa de risco microbiológico em alimentos: conceitos, sistemática e aplicações. Brazilian Journal of Food Technology, 12(4): 266-276.

Schmidt, H., Beutin, L., Karch, H. (1995) Molecular analysis of the plasmid-encoded EDL 933. hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain. Journal of American Society for Microbiology: Infection and immunity, 63(3):1055-1061.

Schroeder, C.M., Zhao, C., DebRoy, C., Torcolini, J., Zhao, S., White, S.G., Wagner, D.D., McDermott, P.F., Walker, R.D., Meng, J. (2002) Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine, and food. Applied and Environmental Microbiology, 68(2): 576– 581.

Silva, L.R. (2002) Pesquisa de *Escherichia coli* O157:H7 em bovinos abatidos em matadouro frigorífico de Curitiba-Paraná. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Paraná.

Silva, N. (2004) *Escherichia coli* O157:H7 em alimentos. Tese de Doutorado em Ciência dos Alimentos)- Universidade Estadual de Campinas - Faculdade de Engenharia de Alimentos.

Silveira, J.B. (2010) Investigação de *Escherichia coli* O157:H7 em carne moída do Estado do Rio Grande do Sul. Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Silveira, L., Marques, A., Machado, J. (2013) Patótipos de *Escherichia coli* associados a infecções entéricas entre 2002-2012. Boletim Epidemiológico Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

Speedy, A.W. (2002) Animal source foods to improve micronutrient nutrition in developing countries: global production and consumption of animal source foods. *The Journal of Nutrition*, 133: 4048-4053.

Tatsuno, I., Horie, M., Abe, H., Miki, T., Makino, K., Shinagawa, H., Taguchi, H., Kamiya, S., Ayashi, T., Sasakawa, C. (2001) ToxB gene on pO157 of Enterohemorrhagic O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. *Infection and Immunity*, 69(11): 6660-6669.

Taylor, C.M., White, R.H.R., Winterborn, M.H., Rowe, B. (1986) Haemolytic-uraemic syndrome: clinical experience of an outbreak in the West Midlands. *British Medical Journal*, 292(6534): 1513–1516.

Tserenpuntsag, B., Chang, H.G., Smith, P.F., Morse, D.L. (2005) Hemolytic Uremic Syndrome risk and *Escherichia coli* O157:H7. *Emerging Infectious Diseases*, 11(12): 1955-1957.

Tu, S., Reed, S., Gehring, A., He, Y., Paoli, G. (2009) Capture of *Escherichia coli* O157:H7 using immunomagnetic beads of different size and antibody conjugating chemistry. *Sensors*, 9: 717-730.

USDA (United States Department of Agriculture) (1997) An Update: *Escherichia coli* O157:H7 in Humans and Cattle. (Disponível em http://www.aphis.usda.gov/animal_health/emergingissues/downloads/ecoupdat.pdf, consultado em 12/05/14).

Veiga, A., Lopes, A., Carrilho, E., Silva, L., Dias, M.B., Seabra, M.J., Borges, M., Fernandes, P., Nunes, S. (2009) Perfil de risco dos principais alimentos consumidos em Portugal. *Autoridade de Segurança Alimentar e Económica*, 1-330.

Viegas, S., Cunha, I., Correia, C., Coelho, A., Maia, C., Pena, C., Bonito, C., Sousa, I., Toscano, M.M., Furtado, R., Santos, S., Lopes, T., Saraiva, M. (2014) Investigação laboratorial de toxinfecções alimentares. *Boletim Epidemiológico do Instituto Nacional de saúde Doutor Ricardo Jorge*.

Vernozy-Rozand, C. (1997) Detection of *Escherichia coli* O157:H7 and other verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC) in food. *Journal of Applied Microbiology*, 82: 537-551.

Vieira, M.A.M. (2009) Ilhas de Patogenicidade. O Mundo da Saúde, São Paulo, 3(4): 406-414.

Watabe, M., Hogg, G.M., Millar, B.C., Crothers, L., Rooney, P.J., Loughrey, A., Goldsmith, C.E., McMahon, M.A., McDowell, D.A., Moore, J.E. (2008) Epidemiological study of *E. coli* O157:H7 isolated in Northern Ireland using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). The Ulster Medical Journal, 77(3): 168-174.

Watanabe, Y., Ozasa, K., Jonathan H. Mermin, Griffin, P.M., Masuda, K., Imashuku, S., Sawada, T. (1999) Factory outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Japan. Emerging Infectious Diseases, 5(3): 424-428.

WHO (1976) The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Bulletin of the World Health Organization, 54(2): 129–139.

WHO (2008). Foodborne disease outbreaks: guidelines for investigation and control. 1-146.

Williams, R.C., Isaacs, S., Decou, M.L., Richardson, E.A., Buffett, M.C., Slinger, R.W., Brodsky, M.H., Ciebin, B.W., Ellis, A., Hockin, J. (2000) Illness outbreak associated with *Escherichia coli* O157:H7 in Genoa salami. Canadian Medical Association or its licensors, 162 (10): 1409-1413.

WHO/FAO (2011) Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in raw beef and beef products: approaches for the provision of scientific advice. Microbiological Risk Assessment Series – World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Wong, C.S., Jelacic, S., Habeeb, R.L., Watkins, S.L., Tarr, P.I. (2000) The risk of the Hemolytic-Uremic Syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. The New England Journal of Medicine, 342(26): 1930–1936.

Wong, C.S., Mooney, J.C., Brandt, J.R., Staples, A.O., Jelacic, S., Boster, D.R., Watkins, S.L., Tarr, P.I. (2012) Risk factors for the Hemolytic Uremic Syndrome in children infected with *Escherichia coli* O157:H7: a multivariable analysis. Clinical Infectious Diseases, 55(1): 33–41.

Zadik, P.M., Chapman, P.A., Siddons, C.A. (1993) Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. Journal of Medicine Microbiology, 39: 155-158.

Web sites consultados:

- www.biomerieux.pt (Consultado em 22/01/14)
- <http://www.cdc.gov/ecoli/reporting-timeline.html> (Consultado 13/02/14)
- http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/FAO_E.Coli_FCC_2011.06.231.pdf (28/02/14)

8 Anexos

Anexo 1 - PCR *mix* Calculation Guide

Para encontrar os volumes corretos para preparar a mistura de PCR, adiciona-se o número total de amostras e controlos a serem analisados, e encontrar o volume do reagente B e C na tabela (Neste caso 15 amostras+ 2controlos=17).

Total number of samples & controls	Probes Reagent B (µl)	Amplification mix Reagent C (µl)	Total number of samples & controls	Probes Reagent B (µl)	Amplification mix Reagent C (µl)
1	5	40	49	265	2100
2	11	86	50	270	2200
3	16	130	51	275	2200
4	22	173	52	281	2200
5	27	216	53	286	2300
6	32	259	54	292	2300
7	38	302	55	297	2400
8	43	346	56	302	2400
9	49	389	57	308	2500
10	54	432	58	313	2500
11	59	475	59	319	2500
12	65	518	60	324	2600
13	70	562	61	329	2600
14	76	605	62	335	2700
15	81	648	63	340	2700
16	86	691	64	346	2800
17	92	734	65	351	2800
18	97	778	66	356	2900
19	103	821	67	362	2900
20	108	864	68	367	2900
21	113	907	69	373	3000
22	119	950	70	378	3000
23	124	994	71	383	3100
24	130	1000	72	389	3100
25	135	1100	73	394	3200
26	140	1100	74	400	3200
27	146	1200	75	405	3200
28	151	1200	76	410	3300
29	157	1300	77	416	3300
30	162	1300	78	421	3400
31	167	1300	79	427	3400
32	173	1400	80	432	3500
33	178	1400	81	437	3500
34	184	1500	82	443	3500
35	189	1500	83	448	3600
36	194	1600	84	454	3600
37	200	1600	85	459	3700
38	205	1600	86	464	3700
39	211	1700	87	470	3800
40	216	1700	88	475	3800
41	221	1800	89	481	3800
42	227	1800	90	486	3900
43	232	1900	91	491	3900
44	238	1900	92	497	4000
45	243	1900	93	502	4000
46	248	2000	94	508	4100
47	254	2000	95	513	4100
48	259	2100	96	518	4100



**Implementação e Validação do Método Horizontal de Detecção
de *E. coli* O157:H7 em carnes**

Andreia Paulos

2014